



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**EFFECTO DE LA CÓPULA REGULADA EN EL PROCESO DE NEUROGÉNESIS DEL
BULBO OLFATORIO EN LA RATA HEMBRA**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
REBECA CORONA GARCÍA-CABRAL

DIRECTOR DE TESIS
DR. RAÚL GERARDO PAREDES GUERRERO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
COMITÉ TUTOR
DRA. MARÍA MAGDALENA GIORDANO NOYOLA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
DRA. MARGARITA MARTINEZ GÓMEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

JURIQUILLA, QUERÉTARO. FEBRERO DE 2013

ÍNDICE GENERAL

Índice General	2
Índice de Figuras	5
Índice de Tablas	8
Lista de Abreviaturas	9
Resumen	12
Summary	13
I. INTRODUCCIÓN	14
II. ANTECEDENTES	18
1. Conducta Sexual Femenina	18
1.1 Características Generales	18
1.2 Componentes de la conducta sexual femenina	18
Conductas proceptivas	19
Conductas receptivas	19
1.3 Cópula regulada (<i>spacing</i>)	21
1.4 Fisiología de la conducta sexual femenina	26
Condiciones hormonales	26
Ciclo estral	26
Manejo de ciclo estral en condiciones de laboratorio	28
1.5 Regulación de la conducta sexual femenina	29
2. Olfato	32
2.1 Características Generales	32
2.2 Detección y procesamiento de olores	33
2.3 Relevancia de los Sistemas Olfatorios en la Conducta Sexual	39
2.4 Sistemas Olfatorios	41
Sistema Olfatorio Principal	41
Fisiología del Sistema Olfatorio Principal	41
Anatomía del Bulbo Olfatorio Principal	43
Sistema Olfatorio Accesorio	48
Fisiología del Sistema Olfatorio Accesorio	48
Anatomía del Bulbo Olfatorio Accesorio	50
2.5 Plasticidad del Sistema Olfatorio	52
3. Neurogénesis en el Bulbo Olfatorio	53
3.1 Neurogénesis en el cerebro adulto	53
3.2 Neurogenesis en el Bulbo Olfatorio	54
Etapas del proceso de neurogénesis del Bulbo Olfatorio	56
Proliferación celular	56

Ciclo celular	56
Proliferación celular en la Zona Subventricular y en la Vía Migratoria Rostral	56
Migración celular	58
Incorporación y Supervivencia de las nuevas neuronas en el Bulbo Olfatorio	59
Diferenciación celular	59
Muerte celular y supervivencia	64
Integración sináptica	64
3.3 Herramientas experimentales destinadas al estudio de proliferación celular y neurgénesis	65
Técnicas	65
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	66
IV. HIPÓTESIS GENERALES	67
V. OBJETIVO GENERAL	67
VI. MATERIAL Y MÉTODO GENERAL	68
1. Sujetos	68
2. Tratamiento hormonal	68
3. Administración del marcador exógeno BrdU	69
4. Diseño experimental	72
4.1 Aparatos	72
4.2 Grupos Experimentales	73
Grupo 1. Control	73
Grupo 2. Exposición a acetato de amilo (C7H14O2)	73
Grupo 3. Exposición a un macho	74
Grupo 4. Cópula regulada (<i>spacing</i>)	75
Grupo 5. Cópula no regulada	76
4.3. Registro de conducta sexual	76
5. Sacrificio	77
6. Histología	77
7. Detección e identificación de células nuevas mediante Inmunohistoquímica	78
7.1 Protocolo General para Inmunohistoquímica revelada con DAB	78
7.2 Protocolo General para Inmunohistoquímica con Fluorescencia	79
8. Análisis Cuantitativo de las células nuevas	80
7.1 Cuantificación de células nuevas (IR-BrdU)	80
7.2 Cuantificación de células con doble marcaje (IR-BrdU/DCX; BrdU/NeuN; BrdU/GFAP; BrdU/cFos)	81
9. Análisis Estadístico	82
VII. EXPERIMENTO 1	83
1. Hipótesis Particular	83
2. Objetivos Particulares	84
3. Diseño Experimental	85

3.1 Histología e Identificación de las células nuevas	87
Cuantificación de células nuevas (BrdU, BrdU/DCX y BrdU/GFAP)	87
VIII. EXPERIMENTO 2	90
1.Hipótesis Particular	90
2.Objetivos Particulares	91
3.Diseño Experimental	92
3.1 Histología e Identificación de las células nuevas	98
Cuantificación de células nuevas (IR-BrdU y BrdU/NeuN; BrdU/GFAP y BrdU/cFos)	98
IX. RESULTADOS	100
1. Experimento 1	100
1.1 Conducta sexual	100
1.2 Proliferación celular en la ZSV y la VMR	102
Cuantificación de la densidad de células BrdU-ir en la ZSV y en la VMR.....	102
Densidad de células BrdU-ir en las regiones de la ZSV	103
Densidad de células BrdU-ir en las regiones de la VMR	105
1.3 Identificación fenotípica de las nuevas células en la ZSV y en la VMR	107
Expresión de DCX en las células BrdU-ir	107
Expresión de GFAP en las células BrdU-ir	110
1.4 Resumen de resultados (Experimento 1)	113
Conducta sexual	113
Proliferación celular en la ZSV y en la VMR	113
2. Experimento 2	115
2.1 Conducta sexual	115
2.2 Supervivencia celular en el BOP y el BOA	118
Cuantificación de la densidad de células BrdU-ir en el BOP y el BOA	118
Densidad de células BrdU-ir en el BOP y en el BOA	118
2.3 Identificación fenotípica de las nuevas células en el BOP y en el BOA	122
Expresión de NeuN y MAP2b en las células BrdU-ir	122
Expresión de GFAP en las células BrdU-ir	126
Expresión de c-Fos en las células BrdU-ir	129
2.4 Resumen de resultados (Experimento 2)	132
Conducta sexual	132
Supervivencia celular en el BOP y el BOA	132
X. DISCUSIÓN	134
1. Experimento 1	134
2. Experimento 2	140
XI. CONCLUSIONES	152
XII. REFERENCIAS	154

Índice de Figuras

Figura 1. Posición normal y postura de lordosis de la rata hembra	20
Figura 2. Grados de lordosis de la rata hembra	21
Figura 3. Regiones cerebrales que se activan en las ratas hembra por la conducta sexual	25
Figura 4. Patrón hormonal del ciclo estral de la rata hembra	27
Figura 5. Cambios fisiológicos y citológicos en las células vaginales y dentro del útero durante el ciclo estral de la rata hembra	28
Figura 6. Regulación de la conducta sexual por el procesamiento de olores	36
Figura 7. Sistemas olfatorios del roedor	38
Figura 8. Organización neuronal del Bulbo Olfatorio Principal	47
Figura 9. Circuitos neuronales y componentes del Bulbo Olfatorio Accesorio	51
Figura 10. Regiones neurogénicas en el adulto	53
Figura 11. Proceso de neurogénesis del Bulbo Olfatorio	55
Figura 12. Maduración de las nuevas neuronas granulares del BOP	61
Figura 13. Sitios de generación de los diferentes tipos de interneuronas granulares y periglomerulares en el adulto	63
Figura 14. Esquema de la inducción de la receptividad sexual	69
Figura 15. Estructura química del BrdU	70
Figura 16. Diseño experimental y administración de BrdU	72
Figura 17. Grupo control	73
Figura 18. Grupo exposición a acetato de amilo	74
Figura 19. Grupo exposición a un macho	75
Figura 20. Grupo cópula regulada	75
Figura 21. Grupo cópula no regulada	76
Figura 22. Diseño experimental para evaluar la proliferación celular de la Zona Subventricular (ZSV) y de la Vía Migratoria Rostral (VMR)	86

Figura 23. Reconstrucción de las regiones de la ZSV y de la VMR	88
Figura 24. Diseño experimental para evaluar la supervivencia celular del Bulbo Olfatorio Principal (BOP) y del Bulbo Olfatorio Accesorio (BOA)	93
Figura 25. Supervivencia de las células nuevas en el bulbo olfatorio marcadas con [3H]-timidina	94
Figura 26. Reconstrucciones sagitales de las regiones del BOP y BOA	99
Figura 27. Densidad de células BrdU-ir/mm ² en la Zona Subventricular y en la Vía Migratoria Rostral	102
Figura 28. Fotomicrografías representativas de las células BrdU-ir localizadas en las regiones de la Zona Subventricular de los diferentes grupos	103
Figura 29. Densidad de células BrdU-ir/mm ² en las regiones Anterior, Medial-Anterior, Dorsal y Ventral de la Zona Subventricular	104
Figura 30. Fotomicrografías representativas de las células BrdU-ir localizadas en las regiones de la Vía Migratoria Rostral de los diferentes grupos	105
Figura 31. Densidad de células BrdU-ir/mm ² en las regiones Anterior, Medial y Posterior de la Vía Migratoria Rostral	106
Figura 32. Fotomicrografías representativas de las células BrdU/DCX-ir localizadas en las regiones de la ZSV y en las regiones de la VMR	107
Figura 33. Fotomicrografías representativas de las células BrdU/GFAP-ir localizadas en las regiones de la ZSV y en las regiones de la VMR	110
Figura 34. Fotomicrografías representativas de las células BrdU-ir localizadas en el Bulbo Olfatorio	118
Figura 35. Densidad de células BrdU-ir/mm ² en el Bulbo Olfatorio Principal y en el Bulbo Olfatorio Accesorio	120
Figura 36. Densidad de células BrdU-ir/mm ² en la región anterior y región posterior del Bulbo Olfatorio Accesorio	121
Figura 37. Fotomicrografías representativas de las células BrdU/NeuN-ir (b-d) y	

BrdU/MAP2b-ir (e-g) localizadas en el BOP y en el BOA	122-123
Figura 38. Fotomicrografías representativas de las células BrdU/GFAP-ir localizadas en el BOP y en el BOA	126
Figura 39. Fotomicrografías representativas de las células BrdU/c-Fos-ir localizadas en el BOP y en el BOA	129
Figura 40. Efecto de la conducta sexual femenina sobre el proceso de neurogenesis adulta del bulbo olfatorio	153

Índice de Tablas

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en ambos experimentos	78
Tabla 2. Sujetos y pruebas conductuales realizadas	86
Tabla 3. Anticuerpos utilizados para evaluar la proliferación celular de la ZSV y de la VMR	89
Tabla 4. Sujetos y pruebas contudctuales realizadas	93
Tabla 5. Anticuerpos utilizados para evaluar la supervivencia y activación celular en el BOP y BOA	97
Tabla 6. Parámetros de conducta en la cópula regulada y no regulada en el experimento 1	101
Tabla 7. Porcentaje de células BrdU-ir/DCX-ir en la Zona Subventricular (ZSV) y en la Vía Migratoria Rostral (VMR)	109
Tabla 8. Porcentaje de células BrdU-ir/GFAP-ir en la Zona Subventricular y en la Vía Migratoria Rostral	112
Tabla 9. Parámetros de conducta en la cópula regulada y no regulada en el experimento 2	117
Tabla 10. Porcentaje de células BrdU-ir/NeuN-ir en el Bulbo Olfatorio Principal y en el Bulbo Olfatorio Accesorio	125
Tabla 11. Porcentaje de células BrdU-ir/GFAP-ir en el Bulbo Olfatorio Principal y en el Bulbo Olfatorio Accesorio	128
Tabla 12. Porcentaje de células BrdU-ir/c-Fos-ir en el Bulbo Olfatorio Principal y en el Bulbo Olfatorio Accesorio	131

Lista de Abreviaturas

Acc-Núcleo Acumbens
ACo-Amígdala Cortical Anterior
APM-Área Preóptica Medial
ARC-Núcleo ARcuato
BAOT-Núcleo del Lecho del Tracto Olfatorio Accesorio
BOA-Bulbo Olfatorio Accesorio
BO-Bulbo Olfatorio
BOP-Bulbo Olfatorio Principal
CAmac- células amácrinas
CCE- capa celular externa
CCI- capa celular interna
CD- comisura dendrítica
CE- células empenachadas
CE- células enanas
CGI- capa glomerular
cGrE- células granulares externas
CGrl- célula granular interna
CMitc- células mitrales caudales
CMit-Células Mitrales
CMitr- células mitrales rostrales
CNO-Capa Del Nervio Olfatorio
CNV- capa del nervio vomeronasal
CPE-Capa Plexiforme Externa
CPI-Capa Plexiforme Interna
CPL-Condicionamiento de Preferencia de Lugar
CProyr- célula de proyección redondeada
CsAC- células superficiales de axón corto
CYux- células yuxtglomerulares
dcc- dendrita caudal comisural de las células principales
dcl- dendrita lateral comisural de las células principales
dcr- dendrita rostral comisural de las células principales
dGl- dendritas glomerulares
DSA-Neuronas de axón corto
E₂-Estradiol
ECM-Matriz Extracelular
Ent-Corteza Entorrinal
EOP-Epitelio Olfatorio Principal
ET-Neuronas empenachadas externas

EVC-Estimulación Vaginicervical
FSH-Hormona Folículo Estimulante
G1, S-Fases del ciclo celular
GABA-Ácido Gama Aminobutírico
GG-Ganglio de Guenberg
Gi2a, G0a-Proteínas expresadas en los Receptores del Órgano Vomeronasal
GL-Capa Glomerular
GnRH-Hormona Liberadora de Gonadotropinas
Gr-Células Granulares
HVM-Hipotálamo Ventromedial
IJGA-Neuronas juxtglomerulares de asociación
INB-Neuronas Intersticiales del Bulbo
INBp- neurona de proyección intersticial del bulbo
INRI- neurona intrínseca intersticial del bulbo
LA- línea alba
LH-Hormona Luteinizante
MAC- célula accesoria principal
MAC-Células Principales Accesorias
Me-Amígdala Medial
MePD-Amígdala Medial posteromedial
Mit-Capa Mitral
NG-Collas Glomerular
NLET-Núcleo Lecho de la Estría Terminal
NMDA-N-metil-D-aspartato, receptor ionotrópico de Glutamato
NOA- núcleo olfatorio anterior.
NOA-Núcleo Olfatorio Anterior
NOS-Neuronas Olfativas Sensoriales
NPP-Neuronas de proyección no-principales
NSC-Células Madre Sensoriales
NSV-Neuronas Sensoriales del Órgano Vomeronasal
NV- nervio vomeronasal
NVM-Núcleo Medial del Hipotálamo
OS-Órgano Septal
OVN-Órgano Vomeronasal
P₄-Progesterona
PGI-Células Periglomerulares
Pir-Corteza Piriforme
PLCo-Amígdala Cortical Posterolateral
PMCo-Amígdala cortical Posteromedial
pmNLET-Núcleo Lecho de la Estría Terminal región posteromedial
PRE-Preñez

PRL-Prolactina
PSP-Pseudo-preñez
PVAM-Neuronas positivas a parvoalbúmina
PVN-Núcleo Paraventricular
RO-Receptores Olfatorios
SOA-Sistema Olfatorio Accesorio
SOP-Sistema Olfatorio Principal
SSA-Neuronas superficiales de axón corto.
St-Estriado
TOL- tracto olfatorio lateral
TOL-Tracto Olfatorio Lateral
TO-Tubérculo Olfatorio
TRMP5-Receptor Transitorio del Potencial de Canal M5
V1R, V2R-Receptores del Órgano Vomeronasal
vlHVM-Porción Lateral del Núcleo Ventromedial del Hipotálamo
VL-Ventrículo Lateral
VMR-Vía Migratoria Rostral
VS-Vaso Sanguíneo
ZSG-Zona Subgranular
ZSV-Zona Subventricular

RESUMEN

La conducta sexual es una conducta reproductiva que es innata y altamente estereotipada. Cuando las hembras están receptivas sexualmente, despliegan diferentes patrones conductuales que incluyen la capacidad de espaciar la estimulación sexual mediante el acercamiento y alejamiento del macho regulando de esta manera la interacción sexual. La cópula regulada promueve cambios neuroendócrinos y conductuales que son necesarios para la preñez. Las claves olfatorias sexualmente relevantes como las feromonas son procesadas por el bulbo olfatorio y son indispensables para el despliegue y el mantenimiento de la conducta sexual. El bulbo olfatorio se encuentra en constante renovación gracias a la incorporación constante de nuevas interneuronas granulares y periglomerulares mediante un proceso llamado neurogénesis. Estas nuevas neuronas se producen en la zona subventricular y en la vía migratoria rostral. A partir de estas regiones, las neuronas nuevas migran a través de la vía migratoria rostral hasta llegar al bulbo olfatorio, donde adquirirán su fenotipo final. Para evaluar el efecto del primer contacto sexual por cópula regulada en el proceso de neurogénesis, evaluamos en ratas hembra adulta la proliferación y la supervivencia de las nuevas células. Nuestros resultados muestran que la cópula regulada incrementa la proliferación celular de la vía migratoria rostral, así como la incorporación de nuevas células al bulbo olfatorio accesorio. Así mismo, encontramos que la cópula regulada aumenta el porcentaje de nuevas neuronas en el bulbo olfatorio accesorio. Finalmente encontramos que las nuevas células del bulbo olfatorio accesorio son activadas como respuesta a la cópula regulada. Estos datos sugieren que el primer contacto sexual por cópula regulada modifica el proceso de neurogénesis del bulbo olfatorio.

SUMMARY

Sexual interaction belongs to the reproductive innate behaviors and it's highly stereotyped. When females are sexually receptive they display different behaviors including the ability to space the sexual stimulation by going back and forth to the male pacing the sexual interaction. This paced behavior promotes neuroendocrine and behavioral changes that are necessary to promote pregnancy. Sexually olfactory signals like pheromones are processed mainly by the accessory olfactory bulbs. The olfactory bulb is a highly dynamic structure because it's constantly adding new granular and periglomerular interneurons, by a process called neurogenesis. The new olfactory neurons are produced in the subventricular zone and the rostral migratory stream. From there, the new neurons migrate through the rostral migratory stream until they reach the olfactory bulb where they acquire their final phenotype. By using adult female rats, we evaluate the effect of the first sexual encounter by paced mating in the neurogenesis process: in the cell proliferation and cell survival. Our results show that paced mating increases the cell proliferation in the rostral migratory stream. Also, paced mating increases the addition of new cells to the accessory olfactory bulb. Additionally we found that paced mating increases the percentage of new neurons in the accessory olfactory bulb. And finally, we found that new cells in the accessory olfactory bulb are activated by paced mating. These results suggest that the first sexual encounter by paced mating modifies the neurogenesis process in the olfactory bulb.

I. INTRODUCCIÓN

La cópula en los roedores es una conducta innata y comienza con el despliegue de varios patrones característicos que la hembra realiza para atraer al macho e iniciar el contacto sexual. El macho, al ser atraído por la hembra, presenta el patrón de conductas típicas de su género como son montar, intrometer y eyacular. En respuesta a esta estimulación la hembra despliega la postura de lordosis que se caracteriza por el arqueamiento del lomo, elevación de la cabeza, tren posterior y finalmente movimiento de la cola hacia un lado permitiendo la inserción peneana (McClintock and Adler 1978; Erskine 1989).

El inicio del contacto sexual y de todos los patrones conductuales femeninos antes mencionados dependen de la liberación secuencial de las hormonas gonadales estradiol y progesterona, y de estímulos olfatorios, lo que determina el periodo de estro o receptividad sexual. La cópula tiene como finalidad la preservación de la especie, por lo que la estimulación que la hembra recibe durante el contacto sexual es fundamental para promover los cambios fisiológicos necesarios para la reproducción. El patrón conductual de aproximación y alejamiento hacia el macho le confiere a la hembra la posibilidad de regular los contactos, la estimulación y el tiempo entre cada uno. A este patrón conductual se le conoce como cópula regulada (McClintock and Adler 1978; Erskine 1989).

Se ha descrito que en condiciones semi-naturales la cópula regulada se presenta de manera espontánea y se caracteriza porque la hembra determina en que momento permite el contacto con el macho aproximándose y alejándose de él. Este patrón tiene como consecuencia que la hembra reciba un menor número de intromisiones, y que los intervalos entre cada intromisión sean más amplios (McClintock and Adler 1978; Erskine 1989). Esta posibilidad de espaciar los contactos copulatorios es muy importante para la hembra ya que esto le permite reducir la sobre-estimulación que puede producir el macho y que entonces la cópula se vuelva aversiva ó simplemente no se presente (Erskine 1989; Erskine, Lehmann et al. 2004).

El patrón de cópula regulada puede replicarse en el laboratorio utilizando cajas que permitan a la hembra determinar los contactos con el macho, teniendo la posibilidad de alejarse

de él (Erskine 1989). Estas cajas se dividen por una barrera de acrílico con un hoyo en medio del tamaño suficiente que permite el paso de la hembra pero no del macho que es de mayor talla. En estudios realizados por nuestro grupo de trabajo (Arzate, Portillo et al. ; Paredes and Alonso 1997; Garcia Horsman and Paredes 2004; Garcia-Horsman, Agmo et al. 2008; Paredes 2009; Corona, Camacho et al. 2011) hemos demostrado que la cópula regulada le produce a la hembra un estado afectivo-positivo evaluado por condicionamiento de preferencia de lugar (CPL).

Las señales olfatorias son fundamentales para los roedores ya que influyen en una serie de conductas sociales como la sexual y la reproductiva, entre otras. Existen dos sistemas encargados de procesar estas señales, los cuales poseen una anatomía distinta. Sin embargo, ambos sistemas son complementarios, y están involucrados en el despliegue y mantenimiento de la conducta sexual. El bulbo olfatorio (BO) es el primer relevo de la información olfatoria dentro del cerebro. Hay dos estructuras anatómicamente separadas en el bulbo olfatorio, el principal y el accesorio. Ambos forman parte de los sistemas olfatorios, por lo que reciben y procesan información olfatoria diferente, de manera clásica, el bulbo olfatorio principal (BOP) recibe información preferentemente de estímulos relacionados con comida y de conoespecíficos, mientras que el bulbo olfatorio accesorio (BOA) recibe información de olores sexualmente relevantes o feromonas. Sin embargo, se requiere del funcionamiento de ambas estructuras del bulbo olfatorio para el adecuado despliegue de la conducta sexual (Baum and Kelliher 2009).

Se ha demostrado que la destrucción del epitelio olfatorio principal por sulfato de zinc en ratones hembra, disminuye la expresión de la receptividad sexual y elimina la capacidad de la hembra para identificar al macho como pareja (Keller, Douhard et al. 2006). Por otra parte, la destrucción del órgano vomeronasal en ratones elimina por completo la receptividad sexual medida por lordosis, por lo que se sugiere que el sistema olfatorio accesorio es determinante para el despliegue de la conducta sexual femenina (Keller, Pierman et al. 2006; Keller, Baum et al. 2009). Así mismo, ratones hembra cuya función del órgano vomeronasal ha sido eliminada dado que no expresan los receptores TRP2, no son capaces de discriminar entre hembras y machos, pero si presentan conducta de cópula. Esta conducta de cópula es similar a la de los machos mostrando montas con latencias muy cortas y movimientos pélvicos, además de mostrar conductas de investigación anogenital (Liman, Corey et al. 1999; Kimchi, Xu et al. 2007). Los

machos que no expresan los receptores TRP2 despliegan conducta de cópula sin problemas, presentando montas indistintamente con hembras y machos, sugiriendo así que el órgano vomeronasal no es indispensable para el despliegue de la conducta de cópula pero si para el reconocimiento de la identidad sexual de sus conespecíficos (Stowers, Holy et al. 2002). Por otro lado, en ratas hembra, la lesión bilateral del BOA reduce significativamente la expresión de lordosis, lo que sugiere que la información procesada por esta estructura es necesaria para el despliegue de la receptividad de la hembra, y por lo tanto para la facilitación de la interacción sexual (Dudley and Moss 1994). Todo esto sugiere que el papel de ambos sistemas olfatorios, el principal y el accesorio o vomeronasal regulan de manera compleja y coordinada la expresión y mantenimiento de la conducta sexual.

El BOA es una estructura laminada compuesta por varios tipos celulares, principalmente por las células periglomerulares (PGI), células mitrales y células granulares (Gr) (Larriva-Sahd 2008). Las células granulares y periglomerulares tienen un papel fundamental en la regulación de las células mitrales (también llamadas de proyección). La activación de los circuitos del bulbo es compleja y ocurre por la llegada de información del medio ambiente y por la llegada de información a través de las fibras centrífugas proveniente de estructuras centrales.

El BO (accesorio y principal) a lo largo de la vida incorpora constantemente células nuevas a sus circuitos mediante un proceso de neurogénesis (Lledo 2008). La proliferación de estas células se lleva a cabo en la zona subventricular (ZSV) localizada a lo largo de las paredes de los ventrículos laterales, y en la vía migratoria rostral (VMR) (Alonso, Ortega-Perez et al. 2008). Una vez que estas células proliferan, migran con dirección rostral hacia el BO donde se dispersan radialmente y maduran, incorporándose como células periglomerulares y granulares (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo 2002; Whitman and Greer 2009).

La migración de las células nuevas ocurre a través de la VMR, migrando una mayor distancia las células que proliferaron en la ZSV que las que lo hicieron en la misma VMR. La llegada al BO les toma aproximadamente 15-20 días. Durante los primeros días, las células migran tangencialmente a través de la VMR en dirección rostral hacia la región central del BO, después, se dispersan radialmente a través de las capas del BO incorporándose a la capa granular

el 80% y el 20% restante a la capa glomerular. Una vez en el BO, las células nuevas maduran, pasando por un periodo crítico en donde mueren aproximadamente el 50%, este periodo crítico ocurre entre el día 15 y el día 30. Finalmente en el día 45, el número de células nuevas se encuentra estable (Petreanu and Alvarez-Buylla 2002).

Evidencia reciente sugiere que algunas conductas reproductivas como la selección de pareja, la preñez, y la lactancia influyen de manera muy específica en el proceso de neurogénesis del BO, promoviendo la proliferación celular en ZSV y VMR, así como la supervivencia celular en BO (Shingo, Gregg et al. 2003; Mak, Enwere et al. 2007; Mak and Weiss 2010). En el presente estudio evaluamos si la conducta sexual, como parte indispensable de las conductas reproductivas, influye en las etapas del proceso de neurogénesis del BO. En específico, evaluamos si el primer contacto sexual, en un modelo en que la hembra pudiera regular los contactos influyen en las diferentes etapas de este proceso: desde la proliferación celular en la ZSV y en la VMR, la llegada de las células nuevas al BO, la supervivencia de las células nuevas en el BO, la determinación del linaje neuronal de las células nuevas. Así mismo evaluamos si las células nuevas del BO, una vez que estuvieran maduras y funcionales responden particularmente a la cópula regulada.

II. ANTECEDENTES

1. Conducta Sexual femenina

1.1 Características Generales

La conducta sexual consiste en el conjunto de despliegues conductuales que la hembra y el macho ejecutan con fines reproductivos. Dentro de los despliegues conductuales que contribuyen a la reproducción de la especie encontramos a la búsqueda y elección de pareja, la conducta sexual como tal, la preñez y el cuidado de las crías hasta que éstas sean independientes. Por lo tanto, la conducta sexual comprende sólo la primera fase del comportamiento reproductor que es el cortejo y la cópula. Sin embargo, si pensamos que la conducta sexual es una conducta innata, compuesta por una serie de patrones conductuales cuya finalidad es preservar a la especie no podríamos explicar porque los animales repiten esta conducta una y otra vez aun cuando ya se han reproducido. Desde este punto de vista, la conducta sólo sería relevante para la especie, no obstante, la conducta es altamente relevante para el individuo, por lo que se le considera una conducta motivacional. De acuerdo a Agmo (1999) la conducta sexual no tiene otra finalidad o propósito para el individuo más que su propia ejecución.

1.2 Componentes de la conducta sexual femenina

En los roedores la conducta sexual puede ser dividida en dos componentes: el proceptivo o de atracción y el receptivo o de ejecución. Un componente importante de la conducta sexual de la rata hembra es la regulación de la cópula (*spacing*, en inglés), la cual pertenece a las conductas proceptivas y consiste en el acercamiento hacia y la huida del macho, lo cual permite que la hembra controle la estimulación que reciba (Beach 1976; Erskine 1989).

El inicio del contacto sexual y de todos los patrones conductuales en las hembras antes mencionados, son altamente dependientes de las hormonas estradiol y progesterona, así como de los estímulos ambientales que ésta reciba: estímulos olfatorios y la estimulación del macho. La conducta sexual ocurre cuando la hembra se encuentra en el periodo de receptividad sexual que

comienza al final del proestro y principio del estro que es cuando se observan niveles altos de progesterona y estrógeno (McClintock and Adler 1978; McClintock and Anisko 1982; McClintock, Anisko et al. 1982).

Conductas proceptivas

Estas conductas 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. El despliegue de las conductas proceptivas depende de la presencia de progesterona, ya que se ha demostrado que en ratas ovariectomizadas y adrenalectomizadas con suplemento de estrógenos no presentan conductas proceptivas, y por el contrario si se les administra exógenamente progesterona intracraneal o intravenoso se recuperan las conductas proceptivas [ver revisión en (Erskine 1989; Erskine, Lehmann et al. 2004)]. Estas conductas ocurren antes y durante la cópula y sirven como indicadores del estado de la hembra así como para regular el intervalo entre las montas e intromisiones.

Dentro de las conductas proceptivas se encuentran una serie de patrones conductuales característicos y 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 en roedores. Uno de los componentes adicionales de las conductas proceptivas es la regulación de la cópula mediante la cual, la hembra determina los intervalos entre cada contacto sexual con el macho (Erskine 1989; Erskine, Lehmann et al. 2004).

Conductas receptivas

La receptividad es la conducta que exhibe la hembra en respuesta a la estimulación física producida por un macho. Cuando la hembra está receptiva sexualmente y la monta un macho ésta asume una postura refleja conocida como lordosis. La lordosis consiste en el arqueamiento del lomo, elevación de la cabeza y el tren posterior y finalmente movimiento de la cola hacia un lado permitiendo que el macho pueda lograr una intromisión (penetración) (Fig.1) (McClintock and Adler 1978; McClintock and Anisko 1982; McClintock, Anisko et al. 1982; Erskine 1989).

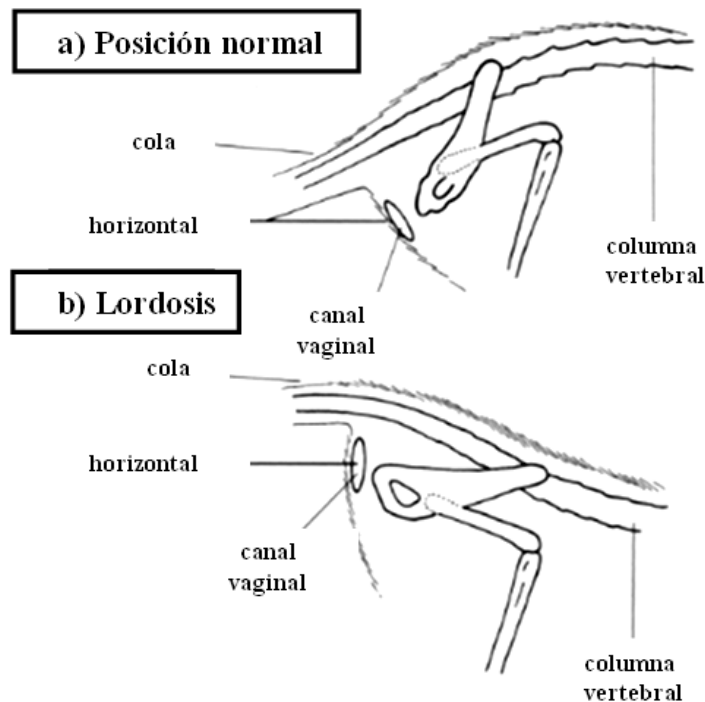


Figura 1. Posición normal y postura de lordosis de la rata hembra. a) En la postura normal que presenta una rata hembra el canal vaginal se encuentra inclinado hacia abajo por la curvatura de la columna vertebral, sin embargo en la postura de lordosis (b) se observa como el canal vaginal se vuelve completamente horizontal para ser accesible a la penetración del macho (*Imagen modificada de Nelson 2000*).

El reflejo de lordosis depende principalmente del estradiol. En la rata, 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. El grado 1 de lordosis es cuando el dorso de la rata se encuentra casi o 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.2).

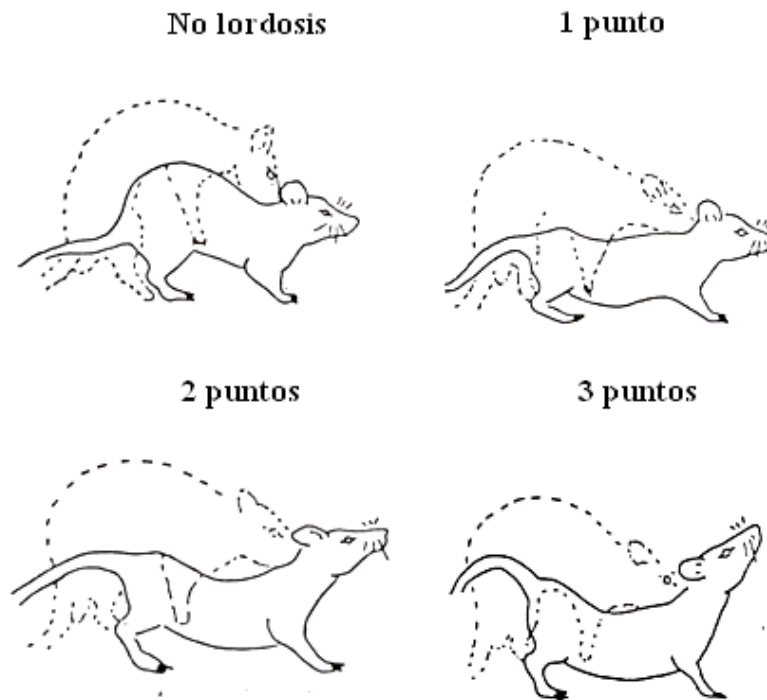


Figura 2. Grados de lordosis de la rata hembra. (Imagen modificada de Hardy y DeBold 1972).

1.3 Cópula regulada (*spacing*)

La cópula regulada es un modelo que refleja lo que ocurre en la naturaleza con la cópula (McClintock and Adler 1978; McClintock and Anisko 1982; McClintock, Anisko et al. 1982), ya que es una conducta que se presenta espontáneamente cuando las ratas están receptivas sexualmente y tiene importantes consecuencias con respecto a la preñez (Erskine, Lehmann et al. 2004), al tamaño de la camada y a la respuesta de estro (Erskine and Hanrahan 1997). Esta conducta compleja es un buen modelo para estudiar los mecanismos por los cuales un estímulo genitosensorial intermitente puede ser traducido en respuestas neuroendocrinas cerebrales.

Las ratas hembra determinan el patrón a seguir de la cópula, y lo hacen mediante el despliegue intermitente y periódico de conductas de solicitud. Se sabe que la frecuencia y el patrón temporal de las intromisiones contribuyen a la inducción de las respuestas neuroendocrinas. Al parecer las hembras muestran una preferencia por los periodos más largos

entre cada intromisión que reciben del macho. La cópula regulada entonces podría considerarse como un tipo de cópula más eficiente ya que cada estímulo que la hembra recibe es más discreto y más intenso desencadenando consecuencias neuroendocrinas y conductuales que no ocurren cuando la hembra no regula la cópula (Paredes and Vazquez 1999; Erskine, Lehmann et al. 2004).

Se ha reportado que cuando las hembras regulan la cópula aumenta la probabilidad de quedar preñadas con un menor número de intromisiones. Este incremento en la probabilidad de quedar preñadas se debe al aumento de la estimulación vagino-cervical que reciben en cada contacto haciendo que las intromisiones resulten más efectivas, reduciendo así el número de intromisiones necesarias para transportar el esperma a través del cérvix y desencadenar el reflejo neuroendocrino que resulta en preñez o pseudo-preñez (PRE/PSP) (Erskine 1989; Erskine and Hanrahan 1997; Erskine, Lehmann et al. 2004).

La cópula regulada desencadena algunos cambios neuroendocrinos como son el incremento agudo en los niveles de la hormona luteinizante (LH), la prolactina, la secreción de la 3α -androstenediol y los niveles de dopamina extracelular en el núcleo accumbens y el estriado (Erskine and Hanrahan 1997). En el caso de la prolactina, es la estimulación vagino-cervical la que 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 PRE/PSP (Erskine 1995; Erskine, Lehmann et al. 2004).

Por todos los antecedentes señalados, el fenómeno conductual de la cópula regulada por la hembra se considera como un buen modelo para el estudio de cambios neuroanatómicos, morfológicos y fisiológicos que ocurren en la hembra asociados a la cópula (McClintock and Adler 1978; McClintock and Anisko 1982; McClintock, Anisko et al. 1982; Erskine 1989; Erskine, Lehmann et al. 2004).

La capacidad que tiene la hembra de regular la estimulación que recibe del macho le permite no ser sobre-estimulada y que la cópula se vuelva aversiva o simplemente no se presente (Erskine 1989). Estudios realizados por nuestro grupo de trabajo (Paredes and Alonso 1997;

Paredes and Vazquez 1999; Martinez and Paredes 2001; Paredes 2008; Arzate, Portillo et al. 2011; Corona, Camacho et al. 2011) han demostrado que cuando la hembra regula los contactos copulatorios se produce un estado afectivo-positivo “placentero” evaluado por CPL.

Así mismo, se ha demostrado también que 10 intromisiones reguladas son suficientes para inducir CPL (Paredes and Vazquez 1999; Paredes and Martinez 2001), sin embargo, recientemente demostramos que la cópula regulada por una hora también genera CPL, sin generar una sobre-estimulación en la hembra (Arzate, Portillo et al. 2011). Este estado placentero inducido por la cópula regulada en hembras parece estar mediado por opioides, y no por dopamina, ya que la infusión de naloxona (antagonista de los receptores μ a opioides) previene la formación de CPL (Garcia-Horsman, Agmo et al. 2008), mientras que antagonistas a dopamina no previenen la formación de CPL por cópula regulada (Garcia Horsman and Paredes 2004).

La estimulación que reciben las hembras a través de las intromisiones realizadas durante la cópula activa varias regiones cerebrales importantes para la reproducción. Estas estructuras que incluyen al APM, la porción ventrolateral del núcleo ventromedial del hipotálamo (vlHVM), la división posterodorsal de la amígdala medial (MePD) y la región posteromedial del núcleo lecho de la estria terminal (pmNLET) se han identificado por el incremento en el número de células inmunoreactivas a Fos después de la cópula regulada o de la estimulación vaginocervical mecánica (Fig. 3). La expresión de Fos en estas regiones parece estar modulada por el número de intromisiones recibidas, así como por el total de la estimulación que recibe. Cuando la hembra regula los contactos copulatorios (recibiendo de 5 a 15 intromisiones) se incrementa la expresión de Fos únicamente en MePD, pmNLET y vlHVM. De manera particular el intervalo entre cada intromisión y la duración de cada intromisión contribuyen a la expresión de Fos en MePD y APM (Erskine 1993).

Se ha demostrado que el APM y el vlHVM son regiones que exhiben una respuesta relativamente consistente de todo o nada como respuesta a la variación en el número de intromisiones, mientras que la MePD muestra una respuesta dependiente del número con respecto a la estimulación vaginocervical recibida, sugiriendo que la MePD es la región que se encarga de la integración y la suma de la cantidad de estimulación vaginocervical, convirtiendo a esta región

en un centro de procesamiento de señales neurales aferentes durante la cópula (Erskine and Hanrahan 1997).

Otro parámetro que parece regular de manera importante la expresión de genes tempranos es el tiempo total que dure la conducta de cópula, ya que se ha descrito que cuando la cópula regulada por la hembra dura un total de 1 hora se observa un incremento mayor en la expresión de Fos en el APM, vIHVM, MePD y NLET así como en otras regiones que no expresan Fos cuando la estimulación es de menor intensidad, como lo son: septum lateral, núcleo hipotálmico paraventricular y dorsomedial, habénula lateral y algunas regiones de la corteza. El grado de estimulación que la hembra recibe cuando regula los contactos copulatorios parece ser proporcional al grado de activación de las neuronas en respuesta a la estimulación (Erskine and Hanrahan 1997).

Por lo tanto el modelo de cópula regulada por la hembra y sus consecuencias neuronales en la rata ofrecen una oportunidad para examinar los efectos de la conducta en la función reproductiva desde una perspectiva neuroetológica que ha sido muy utilizada en los roedores, ya que permite el análisis de las respuestas a los estímulos genitosensoriales manipulando la duración y frecuencia de los mismos.

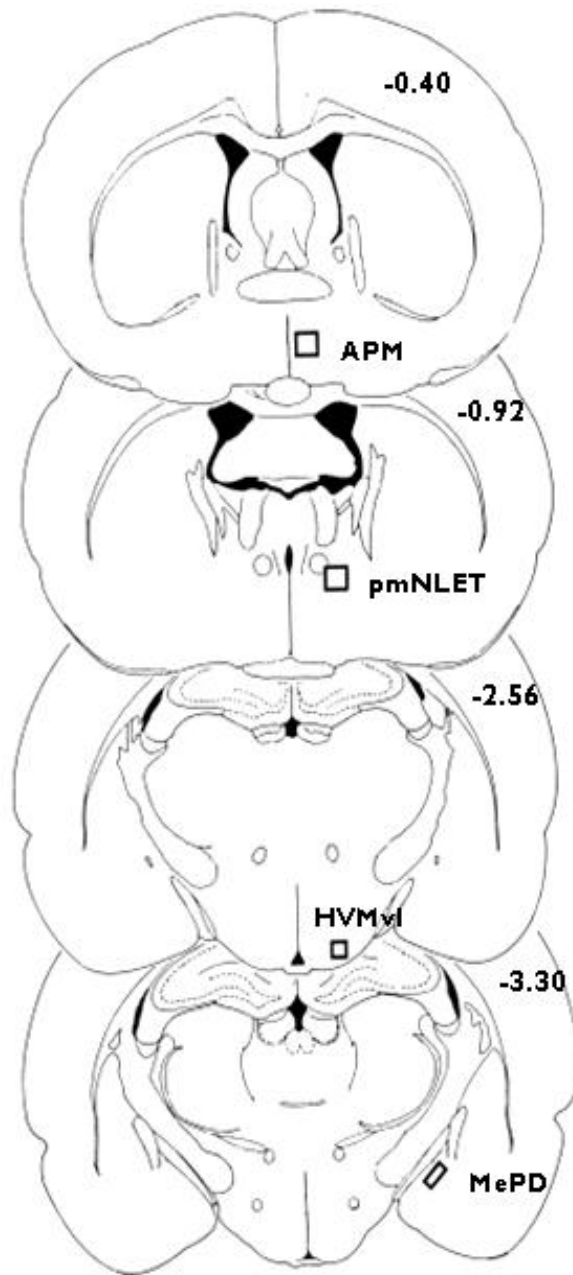


Figura 3. Regiones cerebrales que se activan en las ratas hembra por la conducta sexual. Esquema de cortes coronales de cerebro de rata donde se muestran las regiones que se activan por la conducta sexual (medido por Fos): APM- área preóptico medial, pmNLET- región posteromedial del núcleo lecho de la estria terminal, HVMvl- porción ventrolateral del hipotálamo ventromedial, MePD- división posterodorsal de la amígdala medial. *Imagen tomada de (Erskine and Hanrahan 1997).*

1.4 Fisiología de la conducta sexual femenina

Condiciones hormonales

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 que son: diestro I, diestro II, proestro y estro. En estas etapas se presentan cambios en el tipo de células que están presentes en el útero de la hembra.

El ciclo ovárico comienza con la liberación pulsátil de la GnRH, factor que estimula la liberación de dos hormonas gonadotrópicas primarias de la glándula pituitaria anterior: la hormona folículo estimulante (FSH, por sus siglas en inglés) y la hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés). La FSH a su vez, 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 folículo se vuelva cuerpo lúteo que produce estradiol y progesterona. Por lo tanto la FSH y la 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, siendo el primero la fase de proestro, cuando la hembra se encuentra receptiva sexualmente, y el segundo fase de estro, cuando ocurre la ruptura de los folículos generando la ovulación (Jenkins, Becker et al. 2005).

La concentración de estradiol fluctúa entre 100 y 150 pg/ml en el proestro, aproximadamente 6 a 12 horas antes de la ovulación. La progesterona se incrementa unas horas (4 a 6 horas) antes de la ovulación después de la liberación del estradiol durante el proestro (Jenkins, Becker et al. 2005). Estos cambios en la concentración de hormonas durante el ciclo estral de la rata se ejemplifican en la Fig.4.

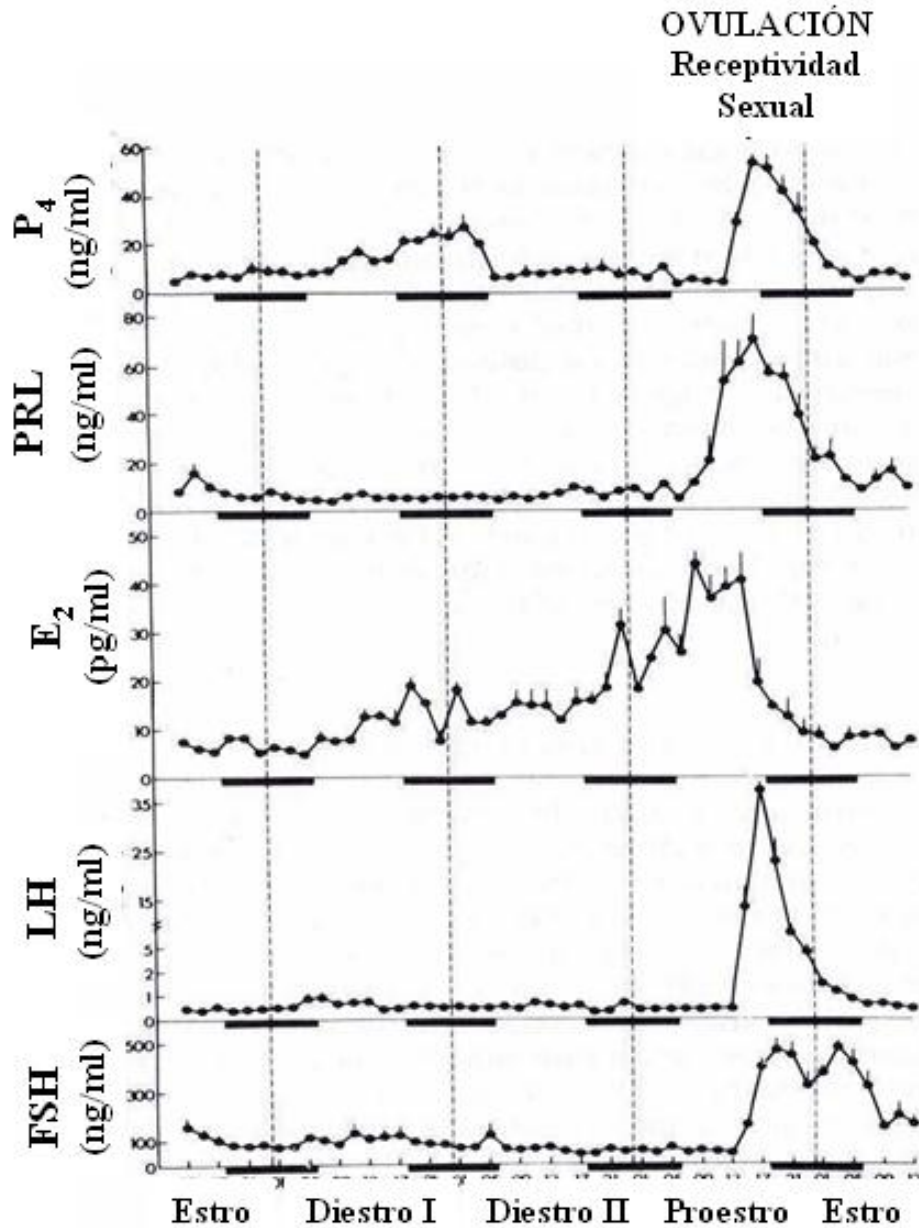


Figura 4. Patrón hormonal del ciclo estral de la ratona hembra. Concentración hormonal en plasma de las hormonas FolículoEstimulante (FSH), Luteinizante (LH), Estradiol (E₂), Prolactina (PRL) y Progesterona (P₄) en el transcurso del ciclo expresado en ng/ml ó pg/ml. En la gráfica se indica el período en el cual ocurre la ovulación y el período de receptividad sexual que es a finales del Proestro inicio del Estro. 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 se correlacionan 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 (ver Fig. 5).



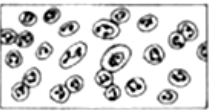





Horas después de la ovulación	12	36	60	84-88
	Estro	Diestro I	Diestro II	Proestro
Citología vaginal				
Desarrollo folicular	Cuerpo lúteo primario 	Folículo primario 	Folículo secundario 	Folículo de Graaf 
Conducta Sexual	-	-	-	+

Figura 5. Cambios fisiológicos y citológicos en las células vaginales y dentro del útero durante el ciclo estral de la rata hembra. (Imagen modificada de Freeman 1994).

Manejo de 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. Aun cuando los animales en condiciones naturales estén en la misma etapa del ciclo estral, presentan diferencias individuales en los niveles hormonales, razón por la cual se tienen dificultades al momento de hacer comparaciones entre organismos (Jenkins, Becker et al. 2005).

El estro conductual se puede inducir, en ratas con remoción de ovarios, con el suministro exógeno a tiempos precisos de ambas hormonas, estradiol y progesterona. La ovariectomía

(remoción de gónadas-ovarios) se ha utilizado como una herramienta que permite el estudio de la conducta sexual de una manera controlada. Cuando una hembra es ovariectomizada, los ciclos hormonales desaparecen y el animal permanece continuamente en diestro I. La administración de estradiol y progesterona de manera secuencial activarán la aparición del ciclo hormonal-estral nuevamente. 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 and Debold 1971).

La conducta receptiva ocurre en promedio 48 horas después de que los niveles de estradiol incrementaron su concentración induciendo así la síntesis de receptores de progesterona en el hipotálamo, sobre los cuales la progesterona podrá actuar. El estradiol y la progesterona administradas exógenamente a ratas hembra ovariectomizadas inducen los patrones indispensables para que presente la conducta de cópula a un nivel comparable al observado en hembras intactas ciclantes (Erskine 1989; Erskine, Lehmann et al. 2004).

1.5 Regulación de la conducta sexual femenina

En los mamíferos, la estimulación vaginocervical (EVC) que la hembra recibe durante la cópula es indispensable para iniciar o inducir los cambios neuroendocrinos que intervienen en la eficiencia reproductiva. En la rata, la estimulación de la cópula desencadena la liberación de prolactina (PRL) dos veces al día, liberación diurna y nocturna, la cual persiste por 10-12 días y provee del soporte luteotrófico necesario para prevenir la regresión normal del cuerpo luteo del ovario. La PRL es necesaria para la implantación del blastocisto y la placentación durante la preñez (PRE) temprana. Estos cambios también generan una secreción continua de progesterona indispensable para el inicio y el mantenimiento de la PRE. Si la estimulación recibida en la cópula es suficiente, la liberación de PRL y de progesterona ocurren aún si las hembras no quedan preñadas, generando así un estado de aciclicidad que puede durar de 10-12 días, éste estado es conocido como pseudopreñez (PSP). Algunos aspectos de la conducta sexual femenina que son críticos para que los cambios en la secreción de PRL ocurran. Existe una regulación

directa entre la EVC que la hembra recibe y el inicio de la PRE (Erskine 1989; Erskine 1992; Erskine 1995; Erskine, Lehmann et al. 2004).

El inicio de los pulsos de PRL requieren que la EVC sobrepase cierto umbral. La estimulación extravaginal de los flancos y el perineo, que constituyen la estimulación somatosensorial, son suficientes para provocar el reflejo de lordosis pero no para inducir un estado de PRE/PSP. Sin embargo, la EVC, que constituye a la estimulación genitosensorial, altera la expresión de la lordosis y la lordosis promueve el inicio de la PRE/PSP. Es por esto, que se requiere de toda la estimulación somatosensorial para la expresión de la lordosis y la estimulación genitosensorial para la inducción de la PRE/PSP.

La estimulación somatosensorial se percibe principalmente gracias a los nervios pélvico y pudendo. El nervio pélvico inerva a las porciones caudales de los tractos reproductivo, digestivo y urinario, incluyendo la vagina, el cervix, la vejiga y el recto, así como la línea media del área perianal. El nervio pudendo inerva las áreas cutáneas de los flancos, el perineo, la región del clítoris. Existe además información vía nervio vago que es importante para la PRE/PSP, ya que una vagotomía abdominal es capaz de prevenir la liberación dual de PRL. La estimulación del campo sensorial del nervio pudendo es suficiente para desencadenar el despliegue de la postura de lordosis, mientras que la estimulación del nervio pélvico se requiere para la inducción del estado de PRE/PSP. Cuando el macho intromete a una hembra promoviendo la lordosis y el estado PRE/PSP a través de la estimulación de los nervios pélvico y pudendo. De manera similar, si se estimula a las hembras artificialmente con una varilla de vidrio y aplicando cierta presión sobre el cuello uterino se puede estimular el nervio pélvico, y si esta estimulación vaginocervical se acompaña además con estimulación de los flancos también se estimula el nervio pudendo, y así en su conjunto promover también la lordosis y el estado de PRE/PSP (Erskine, Lehmann et al. 2004).

Existen mecanismos comunes que interactúan y producen respuestas como el despliegue de la conducta sexual femenina, y los cambios neuroendocrinos necesarios que promueven la eficiencia reproductiva. Existen también varios neurotransmisores y hormonas involucrados en el despliegue y el mantenimiento de la conducta sexual como lo son la dopamina, la noradrenalina,

el glutamato, el estradiol, la progesterona, la GnRH, los péptidos opioides y la oxitocina. Todos estos neurotransmisores y hormonas ejercen sus efectos de manera específica en regiones involucradas en la conducta sexual femenina, como son el APM, la pdMEA y el vlHVM, (Erskine and Hanrahan 1997; Erskine, Lehmann et al. 2004).

El área preóptico medial (APM) es muy importante, ya que integra la información proveniente del pdMEA y de estructuras mediales del hipotálamo como el núcleo periventricular del hipotálamo siendo éste el más relacionado en la producción de respuestas neuroendocrinas provocadas por la EVC. El APM recibe aferencias del pdMEA, núcleo lecho de la estría terminal (NLET) y del vlHVMy. Envía eferencias hacia el núcleo arcuato (ARC) y el vlHVM. Por lo tanto, la ubicación anatómica y sus conexiones le permite al APM modular tanto la conducta sexual femenina como la secreción de PRL (Erskine, Lehmann et al. 2004). Recientemente se demostró en ratas hembra como la lesión del APM produce alteraciones en el despliegue de la cópula regulada, incrementando significativamente las latencias de regreso después de intromisiones y de eyaculaciones, sugiriendo así un papel importante del APM en el control del despliegue de cópula regulada (Meerts, Guarraci et al. 2012). Así mismo, la infusión en el APM de antagonistas a los receptores a dopamina no selectivos (FLU) y selectivos para los receptores D1 (SCH) disminuye las conductas proceptivas (pequeños saltos y movimientos en zigzag) así como el despliegue de la cópula regulada, sugiriendo así que la dopamina que actúa en el APM es importante para el despliegue de la cópula regulada (Graham and Pfaus 2012).

2. Olfato

2.1 Características Generales

Los animales se comunican constantemente a través de olores, sonidos, colores, sensaciones, etc. Esta comunicación les permite interactuar con otros animales y sobrevivir. En particular, para los mamíferos, los olores tienen un papel muy importante en el comportamiento. Los mamíferos liberan una variedad de moléculas hacia el medio ambiente como producto de algún proceso metabólico o una clave quimiosensorial específica. Hay un rango grande entre los tipos de moléculas que son liberadas, desde pequeñas moléculas con características volátiles hasta proteínas más grandes que no son volátiles, y que pueden ser liberadas a través de la orina, heces fecales, secreciones de la piel, secreciones del tracto reproductivo o secreciones especializadas de las glándulas (Shipley, McLean et al. 1995). Estas moléculas que son liberadas proveen de un “perfil de olor” al receptor, ya que contiene información amplia acerca de su liberador, como el sexo, la edad, la salud y el estado reproductivo.

Las claves olfatorias regulan varias conductas de los animales, siendo las más importantes la alimentación, las conductas sociales y las conductas reproductivas como el reconocimiento de individuos de la misma especie, el reconocimiento de depredadores, el reconocimiento de presas, el reconocimiento de una posible pareja sexual, la regulación de las conductas reproductivas, el inicio y mantenimiento de la conducta sexual, la regulación de la conducta materna, la regulación de la conducta de agresión, entre otras (Brennan and Keverne 2004; Yeh, Pu et al. 2008). Para la preservación de las especies, las conductas reproductivas son esenciales, en particular la conducta sexual. El procesamiento olfatorio tiene una gran relevancia en el despliegue de estas conductas, por lo que en este capítulo nos enfocaremos a entender el papel del olfato en la conducta sexual.

La reproducción asegura la supervivencia de la especie y la transmisión de los genes de generación en generación. La eficiencia reproductiva depende en gran medida de las interacciones sociales especie-específicas necesarias para la identificación, el reconocimiento y la elección de una posible pareja. En los roedores la comunicación entre los animales de un mismo grupo está dada por la emisión y detección de claves químicas específicas, también conocidas

como feromonas. El término "feromona" fue utilizado por primera vez en 1959 por Karlson y Luscher (Karlson and Luscher 1959) y proviene de la palabra griega *pherin*, que significa traer o transferir, y *hormon* cuyo significado es excitar. Las feromonas son sustancias excretadas por un individuo (emisor) y detectadas por un segundo individuo (receptor) de la misma especie el cual presentará una reacción fisiológica y conductual como respuesta (Brennan and Zufall 2006). Se ha demostrado que las feromonas son las principales reguladoras de todas las etapas reproductivas, las cuales incluyen la maduración sexual, la identificación de una pareja adecuada para la cópula, la motivación sexual, la conducta sexual, las interacciones entre madre y cría al momento de su nacimiento, etc. (Vandenbergh 1969; Keller and Bakker 2009; Levy and Keller 2009). La presencia de feromonas no es exclusiva de los mamíferos o de una especie, se han identificado también en insectos y peces, siendo en todos un desencadenante de conductas y respuestas endocrinas pre-programadas genéticamente que determinaran la jerarquía social, los rituales de la conducta sexual y el cuidado parental, principalmente.

2.2 Detección y procesamiento de olores

La detección y procesamiento de la información olfatoria se lleva a cabo por el sistema olfativo de los mamíferos. El sistema olfatorio posee varios subsistemas que están sumamente especializados y difieren en su arreglo, su funcionamiento molecular y genética, así como en su anatomía central, su anatomía periférica y en su función. Estos subsistemas también poseen un papel complementario para las conductas dependientes de feromonas (Baum and Kelliher 2009). Dentro de los subsistemas olfatorios podemos encontrar al ganglio de Gruenberg, el órgano septal, el sistema olfatorio principal (SOP) y el sistema vomeronasal o sistema olfatorio accesorio (SOA), siendo el SOP y SOA los más estudiados (ver Fig. 7 para su localización).

En términos generales, en el SOP y en el SOA el procesamiento de olores comienza con su detección en forma de moléculas químicas por receptores específicos localizados en una estructura olfatoria especializada, el epitelio olfatorio. Estos receptores son expresados por neuronas olfatorias sensoriales (NOS), las cuales llevan la información al sistema nervioso central, a través de los nervios olfatorios, donde posteriormente se procesará la información. La cavidad nasal de los roedores contiene dos tipos de NOS: las localizadas en el epitelio olfatorio

principal (EOP) y las localizadas en el órgano vomeronasal (OVN), y, cuyas estructuras dan el nombre a los sistemas olfatorios: SOP y SOA, respectivamente (Baum and Kelliher 2009; Keller, Baum et al. 2009).

El OVN y el EOP constituyen dos circuitos casi independientes para la transducción de la información olfatoria en el sistema olfatorio de los roedores. Estudios clásicos del sistema olfatorio propusieron la hipótesis olfatoria dual en la que le atribuyeron funciones específicas y distintivas a cada población de NOS y sugieren que el OVN, y no el EOP, detecta las claves olfatorias, incluyendo a las feromonas y otras moléculas químicas asociadas con la identidad social y la conducta, mientras que la función del EOP es detectar compuestos volátiles más generales (ver Fig. 13) (Winans and Scalia 1970; Scalia and Winans 1975). Sin embargo, evidencia más reciente muestra que ambos subsistemas olfatorios pueden detectar y procesar claves olfatorias socialmente relevantes (Restrepo, Arellano et al. 2004; Baum and Kelliher 2009; Kang, Baum et al. 2009; Keller, Baum et al. 2009).

Cada estructura que compone a los sistemas olfatorios es indispensable para el adecuado procesamiento de los olores y para la regulación del comportamiento animal. Dentro del cerebro, la información del OVN llega al BOA, mientras que del EOP la información se transmite al bulbo olfatorio principal (BOP). Las conexiones que siguen a partir del bulbo olfatorio (BOA y BOP) son conocidas como conexiones de orden superior y también se encuentran separadas. El BOA proyecta predominantemente a la amígdala medial, cortical posterior y cortical anterior (Scalia and Winans 1975; Martinez-Marcos and Halpern 1999; Leon and Johnson 2003; Martinez-Marcos 2009).

El BOP, por otro lado, proyecta a distintas regiones de la corteza cerebral, incluyendo al núcleo olfatorio anterior, la corteza piriforme y la amígdala cortical (ver Fig. 7) (Orona, Rainer et al. 1984; Scott, Wellis et al. 1993; Leon and Johnson 2003). La información aferente de estos receptores es llevada hacia el bulbo olfatorio por el nervio olfatorio, que constituye el primer nervio craneal. Para estimular a los receptores olfatorios, las moléculas odoríferas que se encuentran en el aire deben entrar a la cavidad nasal, donde son sujetas a corrientes de aire relativamente turbulentas. La duración, el volumen y la velocidad de un olfateo son

determinantes para la efectividad de la estimulación que genera un olor. A pesar de que estos parámetros difieren entre individuos, es un mecanismo relativamente conservado.

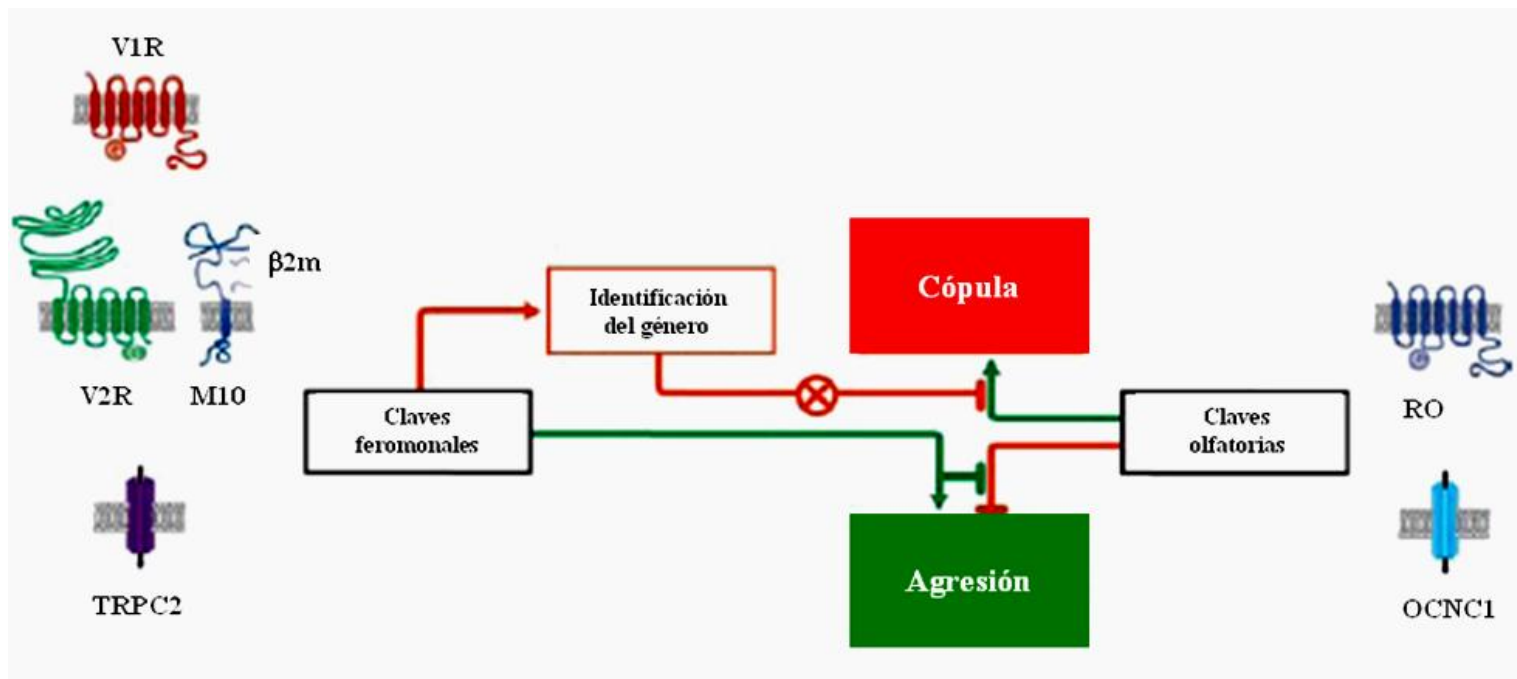


Figura 6. Regulación de la conducta sexual por el procesamiento de olores. Las neuronas del órgano vomeronasal y las del epitelio olfatorio principal procesan de manera diferente los olores. Las neuronas del OVN-Órgano Vomeronasal procesan olores principalmente feromonales y expresan dos familias de receptores: V1R y V2R; los V2R forman un complejo funcional con las moléculas de histocompatibilidad (M10s). La activación de las neuronas que expresan V1R y V2R requieren la expresión del canal TRPC2. El EOP-Epitelio Olfatorio Principal detecta principalmente olores generales y expresa una familia grande de receptores (RO-Receptores Olfativos), y requiere a su vez de la expresión del canal OCNC1. La identificación del género mediante las feromonas o mediante el procesamiento de olores generales puede determinar si el animal presentará una conducta agresiva (en el caso de competencia) ó conducta de cópula. *Tomada de Dulac y Wagner 2006.*

Una vez que las moléculas odoríferas han llegado al EOP o al OVN, deben pasar a través de la capa de moco que cubre al epitelio. La efectividad que un olor tiene para estimular es también determinada por la participación del aire y el moco. El moco se encarga de atrapar a las moléculas de olor, presentarlas y unir las a los diferentes receptores, así como removerlas cuando estén químicamente inactivos. Los olores que por su estructura química no son volátiles, como el caso de las feromonas, requieren del acercamiento físico por parte del roedor para ser detectados, y los olores que son volátiles pueden ser detectados a distancia y son muy importantes para la detección de la presencia de un depredador, de comida, etc., (Shiple, McLean et al. 1995; Leon and Johnson 2003).

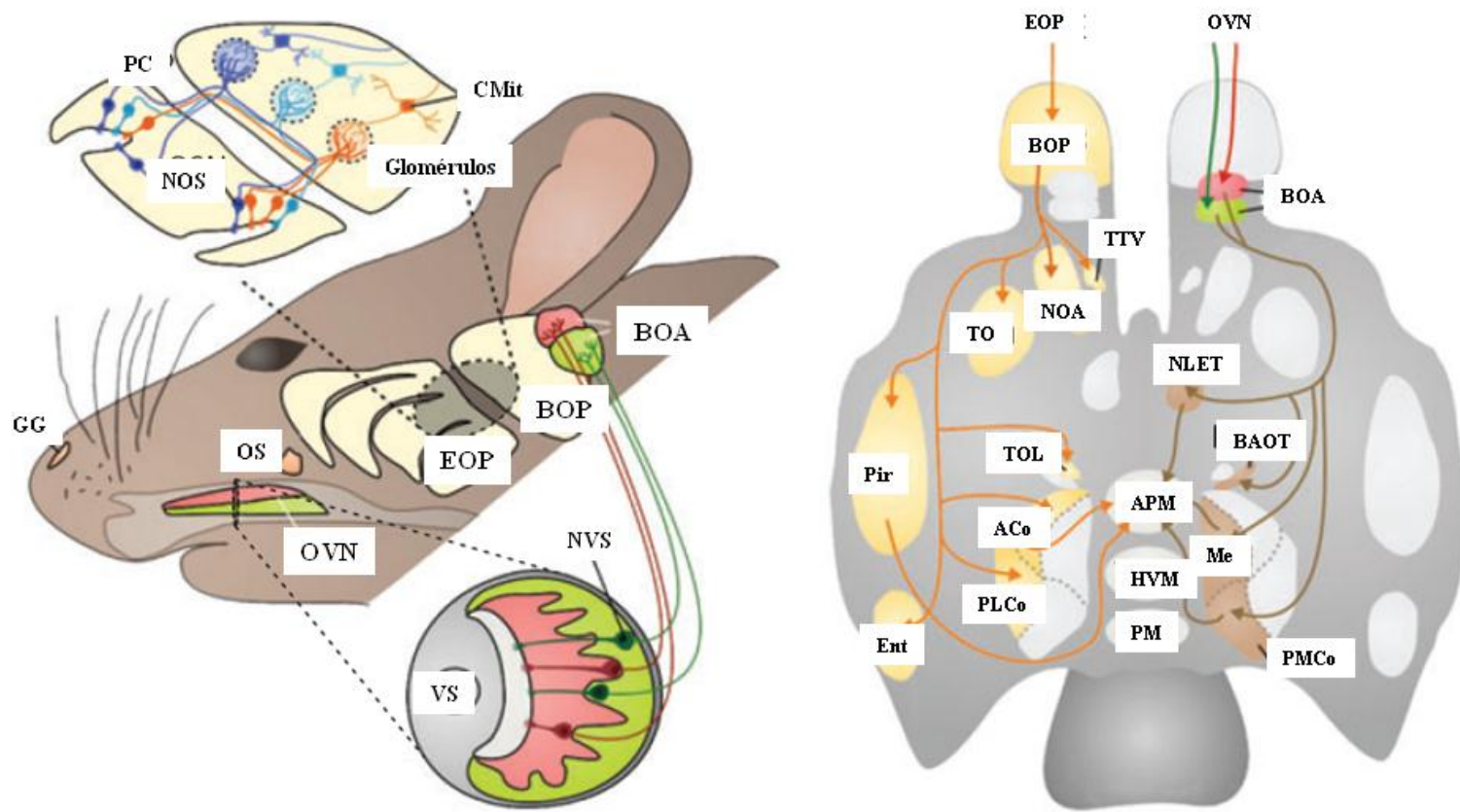


Figura 7. Sistemas olfatorios del roedor. Esquema representativo de la cabeza de un roedor donde se observan los sistemas olfatorios (lado izquierdo): GG- Ganglio de Grueneberg, OS-Órgano Septal, OVN-Órgano Vomeronasal, NVS- Neuronas Sensoriales del Vomeronasal, BOA-Bulbo Olfatorio Accesorio, EOP-Epitelio Olfatorio Principal, BOP-Bulbo Olfatorio Principal, NOS-Neuronas Olfativas Sensoriales, PC-Placa Cribriforme, CMit-Células Mitrales, VS-Vaso Sanguíneo. En el esquema de la derecha se observan las regiones cerebrales que comprenden a los circuitos del Sistema Olfatorio Principal: EOP, BOP, TTV-Tenia tecta ventral, NOA-Núcleo Olfatorio Anterior, TO-Tubérculo Olfatorio, Pir-Corteza Piriforme, Ent-Corteza Entorrinal, TOL-Tracto Olfatorio Lateral, ACo-Amígdala Cortical Anterior, PLCo-Amígdala Cortical Posterolateral, APM- Área Preóptico Medial; y a los circuitos del Sistema Olfatorio Accesorio: OVN, BOA, NLET-Núcleo Lecho de la Estría Terminal, BAOT-Núcleo del Lecho del Tracto Olfatorio Accesorio, Me-Amígdala Medial, PMCo-Amígdala Cortical Posteromedial. *Tomada de Baum y Kelliher 2009.*

2.3 Relevancia de los Sistemas Olfatorios en la Conducta Sexual

La activación y funcionamiento del SOP y SOA son muy importantes para el despliegue y mantenimiento de la conducta sexual. En estudios realizados por el grupo de Keller y cols. (Keller, Douhard et al. 2006; Keller, Baum et al. 2009) se ha descrito que la lesión tanto del OVN como del EOP puede afectar la receptividad sexual de la hembra. La remoción total del OVN disminuye notablemente el despliegue de lordosis (reflejo de la receptividad sexual) pero no lo desaparece (Keller, Pierman et al. 2006). Al realizar una lesión en el EOP con sulfato de zinc ($ZnSO_4$) la lordosis disminuye poco y no tan drásticamente. La inhabilitación genética de los NOS del OVN (Kiselyov, van Rossum et al. ; Leypold, Yu et al. 2002; Stowers, Holy et al. 2002) y la remoción del OVN afecta las conductas de agresión hacia un intruso y la conducta de monta, sin embargo, no afecta la discriminación sexual (Petrulis and Johnston 1999; Petrulis, Peng et al. 1999). Así mismo, la inactivación de los receptores Trpc2 del OVN en ratones transgénicos ha mostrado que la ausencia de función del OVN promueve en ratones hembra alteración en la discriminación sexual y en el despliegue de la cópula ya que copulan con conductas similares a las de los machos, presentando montas e inspecciones anogenitales (Liman, Corey et al. 1999; Kimchi, Xu et al. 2007). Estos resultados muestran que aunque clásicamente se ha diferenciado el tipo de olores que procesa cada sistema, al parecer existe una cooperación entre ambos sistemas que integra la información y que es relevante para el despliegue de parámetros de la conducta sexual, ya que, al inhabilitar tanto el OVN como el EOP por separado, se disminuye en mayor o menor medida el despliegue de la conducta, pero no desaparece por completo. Esto sugiere la existencia de una conexión 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 de ambos sistemas para el procesamiento de olores.

La integración de la información olfatoria podría explicarse mediante los puntos de convergencia en ciertas regiones corticales y subcorticales, como la amígdala cortical posterior y la medial de las vías procedentes del BOA y BOP. Así mismo, además de la convergencia de los sistemas olfatorios a nivel central, también podría explicarse por la integración de la información

olfatoria que se sugiere puede estar ocurriendo a nivel interno, dentro del bulbo olfatorio, ya que hay un par de células recientemente descritas, y de las cuales aún no entiende bien su función, pero que comunican directamente al BOA con el BOP. Estas células son las células principales olfatorias (MAC`s por sus siglas en ingles) y las neuronas intersticiales del bulbo (INB`s, por sus siglas en inglés) (Larriva-Sahd 2008).

El papel de la amígdala parece ser muy importante en el procesamiento de olores de todo tipo. La mayor parte de las proyecciones que inervan la amígdala medial vienen del BOA, sin embargo, evidencia reciente sugiere que una pequeña fracción de las proyecciones que llegan a la amígdala medial viene del BOP (Lin, Restrepo et al. 2007; Thompson, Salcedo et al. 2012). Tanto el SOP como el SOA son sistemas capaces de responder ante el mismo tipo de estimulación olfatoria. Mediante la inyección del trazador retrógrado toxina de cólera B (que va en dirección de axón a soma neuronal) en la amígdala medial se observaron células marcadas en la capa mitral del BOP, lo cual indica una conexión directa del BOP con la “amígdala vomeronasal”. Además, al exponer a las ratonas hembra, a las cuales se les inyectó el trazador, a orina de machos, orina de otras hembras u orina de gato (depredador) se indujo la activación de Fos (un gen de expresión temprana) en las células de la amígdala medial (que reciben proyecciones del BOP) únicamente en las hembras expuestas a orina de machos. Esto sugiere que hay transmisión directa de información del BOP a la “amígdala vomeronasal” (Kang, Baum et al. 2009).

En estudios con el receptor TRMP5 (receptor transitorio del potencial de canal M5) que es un participante de la cascada de señalización de la transducción del estímulo olfatorio, utilizando el ratón transgénico TRMP5-GFP (GFP-proteína verde fluorescente) que expresa GFP bajo la dirección del promotor TRMP5 y el trazador retrógrado de la toxina del cólera inyectado en la amígdala medial se ha observado co-localización significativa entre las fibras provenientes de las NOS del EOP que expresaron el TRMP5 y las fibras de la amígdala medial en el BOP. Esto sugiere que hay una conexión directa desde el EOP hacia la amígdala medial, lo que apoya la idea de la amígdala medial sea un sitio de convergencia entre el SOA y SOP (Lin, Restrepo et al. 2007; Thompson, Salcedo et al. 2012).

Como hemos visto, las señales químicas liberadas afectan la conducta sexual de machos y hembras. Sin embargo, la experiencia sexual que se adquiere a lo largo de la vida también provoca cambios en la conducta relacionados con el olfato. Por ejemplo, ratones y rata macho con experiencia sexual prefieren el olor de una hembra receptiva a una hembra no-receptiva, y, en cambio, los machos sin experiencia sexual no muestran ninguna preferencia, lo que indica que los roedores macho son capaces de desarrollar una habilidad del procesamiento de la información olfatoria, con respecto al estado hormonal de las hembras (Pfaff and Pfaffmann 1969; Honda, Sakamoto et al. 2008). La atracción que muestran las hembras (roedores) hacia los olores de machos o de otra hembra en estro es menor que la que muestran los machos, lo que sugiere un dimorfismo sexual en la detección y procesamiento de la información olfatoria de la orina (Baum and Keverne 2002). Se ha demostrado, en ratas hembra, que las NOS de la región apical del OVN, así como la región rostral del BOA son activadas (expresión de Fos) tras la estimulación con orina de machos (Inamura, Kashiwayanagi et al. 1999; Portillo and Paredes 2004). Aparentemente, la diferencia entre ambos sistemas olfatorios va más allá de su acomodo anatómico y la función de los receptores, depende más de las diferentes estrategias que el sistema utiliza para el procesamiento de la información química.

A continuación describiré brevemente de cada uno de los sistemas olfatorios y sus componentes.

2.4 Sistemas Olfatorios

Sistema Olfatorio Principal

Fisiología del Sistema Olfatorio Principal

El SOP es un sistema capaz de integrar el patrón de moléculas volátiles producidas por un animal e interpretar esta información para producir una respuesta. Dado que gran parte de las moléculas volátiles contienen información relacionada con la comida, y el medio ambiente, a este sistema se le consideró por mucho tiempo un sistema olfatorio más general y menos especializado. Sin embargo, ahora se conoce su capacidad para procesar feromonas sexuales para promover una respuesta conductual, una respuesta de lordosis y permitir la cópula (Brennan ; Dorries, Adkins-Regan et al. 1997).

Como se mencionó previamente, las moléculas volátiles entran en contacto con los receptores expresados en las NOS del EOP. El EOP se encuentra en la región posterior de la cavidad nasal. Cada NOS expresa únicamente un tipo de receptor (Buck and Axel 1991; Scott, Wellis et al. 1993). El arreglo de células en el EOP es columnar, formadas por las NOS, las células de soporte, las células microvillares y las células basales. Los cuerpos celulares de las NOS ocupan dos tercios del EOP, sus dendritas apicales se extienden en la superficie formando cilios que se distribuyen en la capa de moco, y es en los cilios donde ocurre la transducción quimiosensorial. Los axones, que son no mielinizados, emergen de los cuerpos celulares de las NOS formando un conjunto de axones que penetra la lámina basal, y son envainados por las células de Schwann y por la glía envolvente. Este conjunto de varios axones conforman al nervio olfatorio que pasa a través de la placa cribiforme hasta llegar a la capa glomerular del BOP (Au, Treloar et al. 2002). El sistema olfatorio posee una gran capacidad plástica y potencial reparativo, en particular la neurogénesis que ocurre en la lámina basal del llamado “neuroepitelio olfatorio” (EOP) es esencial para el mantenimiento de la función olfatorio sensorial (Leung, Coulombe et al. 2007), reemplazando a las NOS cada 40 días (Shipley, McLean et al. 1995).

La transducción olfatoria es muy rápida y ocurre en los receptores de las NOS. Estos receptores olfatorios son proteínas de siete pasos transmembranales que codifican para aproximadamente 1000 receptores en roedores, siendo así la familia más grande de genes en mamíferos. Estos receptores están unidos a proteínas G que a su vez activan sistemas de segundos mensajeros como la adenilato ciclasa, AMPc e IP₃ para modular canales iónicos permitiendo la producción de potenciales de acción que son conducidos al BOP, siendo el BOP el sitio inicial en donde se integra la información neural del sistema olfatorio. Este sistema olfatorio está organizado en miles de módulos de procesamiento de señal, llamados glomérulos. Los glomérulos son estructuras relativamente grandes, esféricas de entre 100 y 200µm de diámetro (Scott, Wellis et al. 1993; Mori, Nagao et al. 1999). En el BOP, los axones de las NOS que expresan el mismo tipo de receptor convergen en uno o dos glomérulos (típicamente uno lateral y uno medial). Todos los axones que convergen en un glomérulo expresan el mismo tipo de receptor (Mombaerts 1997; Mombaerts 2004).

En el glomérulo, los axones de las NOS realizan contactos sinápticos con las dendritas apicales de las células mitrales y empenachadas, que constituyen a las células principales y de proyección del BOP, y, con una población de interneuronas llamadas células periglomerulares. Los axones provenientes de las células mitrales del BOP proyectan hacia diferentes núcleos de la paleocorteza: la corteza piriforme, la corteza entorrinal, el núcleo olfatorio anterior, el tubérculo olfatorio, y la amígdala lateral y medial. Estas cortezas son conocidas en conjunto como corteza olfatoria primaria. A su vez éstas estructuras se encuentran conectadas con otras estructuras centrales necesarias para el procesamiento cognitivo y perceptivo de las claves químicas (Mombaerts 2004).

Anatomía del Bulbo Olfatorio Principal

El BOP es una estructura laminada y altamente organizada. Es la estructura encargada de discriminar y procesar la información olfatoria que será enviada para su posterior procesamiento en el resto del sistema olfatorio. El BOP está formado por varios tipos celulares: 1) células periglomerulares anaxónicas (sin axón) y células periglomerulares con axón, 2) células anaxónicas pero con segmentos iniciales de axones, de tamaño medio (parvoalbúmina+), células periglomerulares (óxido nítrico sintetasa+), y células granulares (calretinina+), 3) células de axón corto que proyectan hacia regiones olfatorias de alto orden (cortezas), y que no son principales, y, 4) células yuxtglomerulares (conectan entre glomérulos) compuestas por células empenachadas (tirosina hidroxilasa+, GABA+) (Kosaka and Kosaka 2005). Dentro de éstas, las interneuronas periglomerulares y granulares, así como las neuronas principales mitrales y empenachadas constituyen a las células básicas del procesamiento olfatorio del BOP, y a las cuales prestaremos mayor atención en este trabajo. La localización de cada una de las células previamente mencionadas se encuentran distribuidas en seis capas que componen al BOP: capa del nervio olfatorio, capa glomerular, capa plexiforme externa, capa de células mitrales, capa plexiforme interna y capa de células granulares (ver Fig. 8). Cada una de las células principales del BOP tiene una función particular en el procesamiento olfatorio.

La entrada de información al BOP inicia en la capa glomerular, donde se encuentran los glomérulos. Los cuerpos celulares de las células mitrales se localizan en la capa que lleva su nombre, capa de células mitrales, y poseen un dendrita apical que forma parte de los glomérulos

y algunas dendritas secundarias laterales que se extienden en la capa plexiforme externa, y que están conectadas con las interneuronas de la capa granular, las células granulares. Los axones de las células mitrales forman el tracto olfatorio lateral, el cual llevará la información del BOP hacia estructuras centrales como la corteza piriforme (Price y Powell 1970^a; Walz et al., 2006).

La modulación de las células mitrales está dada por dos clases de interneuronas: las células periglomerulares y las células granulares mediante una sola conexión, una sinapsis dendrodendrítica recíproca. Esta sinápsis se forman entre las interneuronas inhibitorias (células periglomerulares y células granulares) que contactan con la célula mitral, y a su vez, las células mitrales hacen sinapsis con las interneuronas, de tal manera que se pueden regular mutuamente (Scott, Wellis et al. 1993; Mori, Nagao et al. 1999; Au, Treloar et al. 2002).

Las células empenachadas son el segundo tipo de células de proyección que tiene el bulbo olfatorio, y de acuerdo a su localización son conocidas como células empenachadas profundas, medias externas (Liu and Shipley 1994; Pankevich, Mueller et al. 2009). Las dendritas apicales de las células empenachadas medias y profundas se comportan de manera similar a las células mitrales, ya que también poseen una arborización extensa en un solo glomérulo (Orona, Rainer et al. 1984). De acuerdo a las diferencias que tienen las células mitrales y empenachadas en su organización laminar y quizás también en sus proyecciones corticales, se ha sugerido que ambas células formen vías paralelas para el procesamiento de la información olfatoria (Shepherd, Chen et al. 2007).

Las células periglomerulares que se encuentran localizadas en la capa glomerular, constituyen a una población heterogénea de interneuronas que rodean a los glomérulos. Estas células pueden ser clasificadas en varios subtipos de acuerdo a su fenotipo molecular, a sus características morfológicas y a sus conexiones sinápticas. La mayoría de las células periglomerulares son GABAérgicas, pero existe una gran población que son dopaminérgicas, o dopaminérgicas que co-expresan GABA. Las subpoblaciones de células periglomerulares expresan diferentes proteínas de unión a calcio, como la calretinina y la calbindina. En general, las células periglomerulares forman sinapsis dendrodendríticas con las dendritas apicales de las células mitrales y empenachadas. Sin embargo, algunas de ellas reciben entradas de información

directamente de las NOS (Kosaka and Kosaka 2005; Sinchak, Dewing et al. 2007). Las células periglomerulares modulan la información sináptica de los glomérulos con los que tienen sinapsis, pero también, mediante circuitos de inhibición y excitación lateral son capaces de regular la información entre los diferentes glomérulos (Wachowiak and Shipley 2006).

Las células granulares constituyen a la población más grande de interneuronas en el bulbo olfatorio, superando por mucho el número de las células mitrales (100:1). Los cuerpos celulares de las células granulares se encuentran en la capa de células granulares localizada en la parte más interna del bulbo olfatorio. Son células que no poseen axón, pero tienen una dendrita grande y extensivamente ramificada dentro de la capa plexiforme externa. Las células granulares se pueden clasificar en diferentes tipos de acuerdo a su localización en el BOP. Aquellas que están localizadas en la profundidad de la capa granular con sus dendritas localizadas en la porción más profunda de la capa plexiforme externa, interactúan con las dendritas de las células mitrales. Las células granulares que se localizan en posiciones más superficiales en la capa granular tienen arborización dendrítica localizada en la porción superficial de la capa plexiforme externa, donde predominan las dendritas laterales de las células empenachadas, así mismo, se encuentran células granulares localizadas a lo largo de la capa plexiforme externa presentando arborizaciones dendríticas más extensas (Orona, Rainer et al. 1984; Gerecke, Kishore et al. 2012).

Las células granulares se encargan de la modulación de la información que las células de proyección sacarán del bulbo olfatorio para enviarlo al resto de las estructuras centrales que forman a los sistemas olfatorios. Para esta modulación, las células granulares forman sinapsis dendrodendríticas con las dendritas laterales de las células mitrales y empenachadas en la capa plexiforme externa. Como se mencionó previamente, las células granulares son anaxónicas, por lo que su único modo de transferir información es a través de las sinapsis dendrodendríticas que establecen gracias a sus espinas dendríticas en la capa plexiforme externa; sin embargo, las células granulares reciben entradas de información adicional en la capa granular. Esta información adicional se da a través de mecanismos sinápticos axodendríticos que provienen de fibras centrifugas de varias regiones centrales. Muchas de las fibras centrifugas que entran al bulbo olfatorio lo hacen a través de la comisura anterior, del núcleo olfatorio anterior, de la corteza piriforme, de la corteza periamigdalóide, o de la corteza entorinal lateral. El tipo de

información que entra al bulbo olfatorio puede ser de tipo colinérgico y GABAérgico si proviene inicialmente del núcleo de la banda diagonal, serotoninérgico de los núcleos medial y dorsal del rafé, o noradrenérgico del locus ceruleus (Fig. 8) (Sinchak, Dewing et al. 2007).

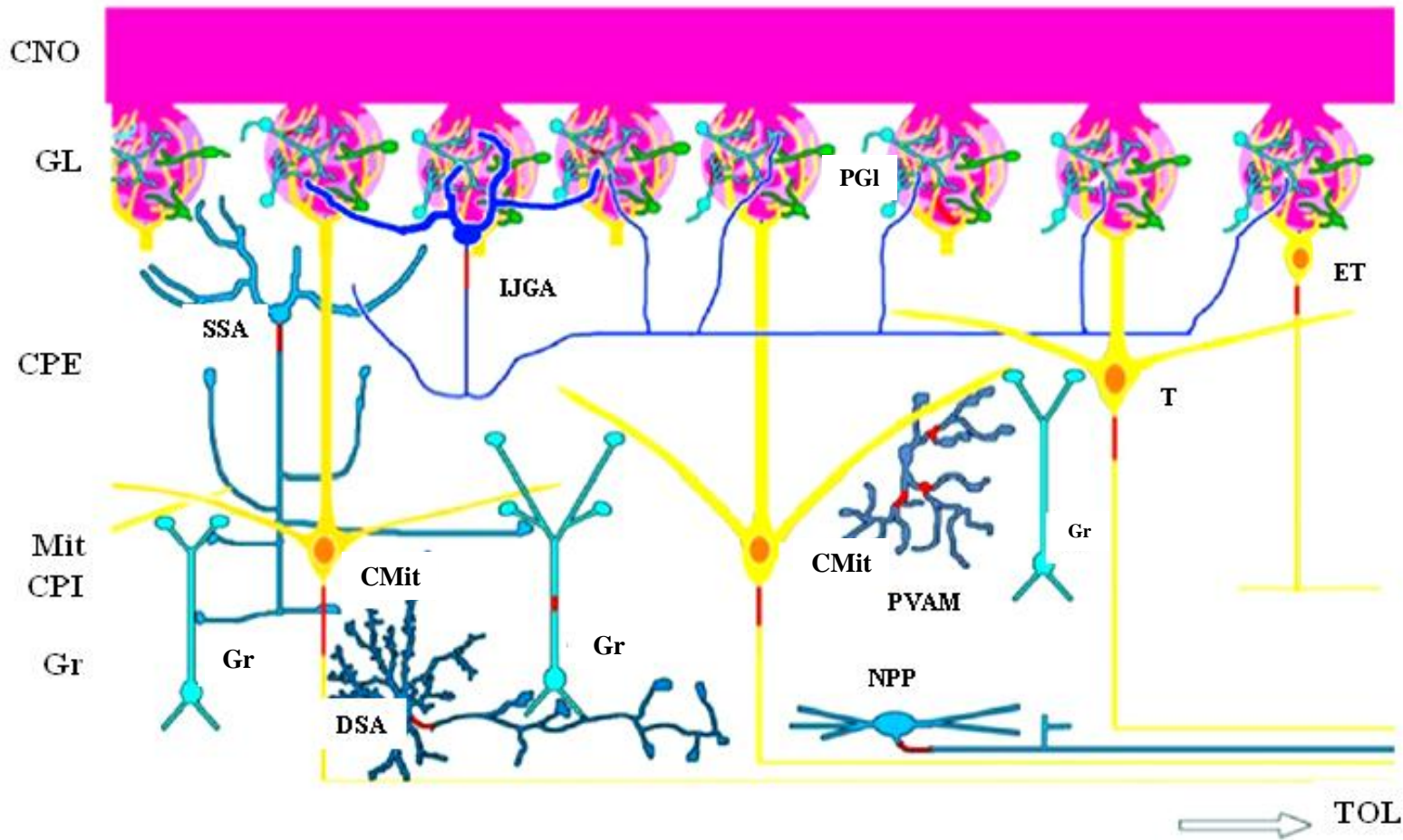


Figura 8. Organización neuronal del Bulbo Olfatorio Principal. Las diferentes células que comprenden al BOP se localizan en las diferentes capas: CNO-Capa Del Nervio Olfatorio, GL-Capa Glomerular, CPE-Capa Plexiforme Externa, Mit-Capa Mitral, CPI-Capa Plexiforme Interna, siendo las células: G-Células Granulares, M-Células Mitrales, PG-Células Periglomerulares, DSA-Neuronas de axón corto, ET-Neuronas empenachadas externas, IJGA-Neuronas juxtaglomerulares de asociación, TOL-Tracto Olfatorio Lateral, NPP-Neuronas de proyección no-principales, PVAM-Neuronas positivas a parvalbúmina, SSA-Neuronas superficiales de axón corto. Tomada de Baum y Kelliher 2009.

Sistema Olfatorio Accesorio

Fisiología del Sistema Olfatorio Accesorio

El SOA o sistema vomeronasal ha sido considerado por mucho tiempo como el principal circuito mediador de feromonas. El SOA está compuesto por un órgano receptor: el OVN, el BOA y sus conexiones centrales, principalmente la amígdala y el hipotálamo. Las claves olfatorias que son percibidas pueden modificar la liberación de hormonas por parte del hipotálamo (Rajendren, Dudley et al. 1993) y producir cambios fisiológicos y en la conducta sexual (Keller, Pierman et al. 2006; Keller, Baum et al. 2009)

Este sistema está presente en la mayoría de los tetrápodos terrestres. El OVN fue descrito por primera vez por el anatomista Danés Ludvig Jacobson en 1813. El OVN está embebido en la base del Septum sobre el hueso vómer, contiene un epitelio sensorial que no se encuentra expuesto directamente al flujo de aire, por lo que posee un mecanismo de bombeo que permite el lavado de cualquier molécula que se adhiera al moco del epitelio para su detección. Es una estructura bilateral de forma tubular localizada sobre el hueso vómer en la parte superior del paladar, en la región rostral de la cavidad nasal. El epitelio sensorial del OVN está compuesto de neuronas bipolares glutamatérgicas cuyas proyecciones dendríticas se encuentran en la región interna del OVN, conocida como lúmen y las proyecciones axonales llegan al BOA. La región del lúmen del OVN, dada su estructura tubular cerrada, está limitada a la detección de moléculas de naturaleza soluble y no volátiles que sean bombeadas activamente desde la cavidad nasal para poder ser detectadas por los receptores de la NOS. El epitelio sensorial contiene células sustentaculares que ocupan todo el grosor del epitelio, y un conjunto de células madre que se pueden diferenciar en neuronas sensoriales nuevas durante el transcurso de la vida del animal. Cuando los receptores de las neuronas olfativas sensoriales localizadas en el OVN degeneran, las células madre migran hacia su posición final y se diferencian, enviando sus axones hacia el BOA (de la Rosa-Prieto, Saiz-Sanchez et al. ; De La Rosa-Prieto, Saiz-Sanchez et al. 2009).

El SOA es un sistema dicotómico que se aprecia desde el órgano receptor, en las células apicales y basales del epitelio que conforma al OVN, hasta sus proyecciones hacia las regiones anterior y posterior del BOA. Las dos poblaciones de células del OVN expresan diferentes

receptores que son activados por ligandos distintos y desencadenan diferentes respuestas conductuales. Los receptores de las NOS del OVN pertenecen a dos familias y su expresión se encuentra diferencialmente distribuida. Los genes que codifican para las proteínas de los receptores poseen siete pasos transmembranales. La primer familia de genes que fue identificada se expresa en la región apical de las NOS y co-expresan a las proteínas Gi2a. La segunda familia de genes se expresa en la región más basal de las NOS y co-expresan la proteína G0a. Las proteínas G se expresan en etapas postnatales tempranas (P10) en el OVN, y en estos momentos también la organización dicotómica de las fibras de las NOS comienzan a hacerse evidente (Martinez-Marcos and Halpern 1999; Martinez-Marcos 2009).

Las células mitrales y células empenachadas del BOA envían sus proyecciones hacia algunos núcleos del sistema límbico: el núcleo de la cama de la estría terminal, el núcleo de la cama del tracto olfatorio accesorio, y principalmente a los núcleos medial amigdaloides y el núcleo cortical posteromedial de la amígdala, éstos dos últimos son llamados comúnmente amígdala vomeronasal (Scalia and Winans 1975). Las neuronas localizadas en esta región envían sus proyecciones hacia los núcleos hipotalámicos asociados con la reproducción, agresión y cuidado parental: el área preóptica medial, el hipotálamo ventromedial, los núcleos premamilar y el núcleo supraóptico. A los núcleos medial posteromedial de la amígdala, le llega información de ambas subregiones del BOA (Salazar and Brennan 2001; Martinez-Ricos, Agustín-Pavon et al. 2008). Por otra parte, la amígdala proyecta también hacia el BOA a través de la estría terminalis, siendo éste uno de los mecanismos de retroalimentación. Tanto el hipotálamo como la amígdala, que envían proyecciones al BOA, poseen una gran cantidad de receptores a estrógenos, por lo que la sensibilidad a los niveles hormonales podría modular en cierta medida la retroalimentación del BOA (Fan and Luo 2009).

Las poblaciones de interneuronas del BOA (células granulares y periglomerulares) tienen un papel fundamental en la inducción y mantenimiento de la sincronización de las células principales o de proyección, que pueden ser células mitrales o células empenachadas. La regulación funcional del BOA es compleja por la gran cantidad de información que entra por los glomérulos, y de las fibras centrífugas. Los sistemas centrífugos comprenden entrada de información tanto excitatoria como inhibitoria de la corteza piriforme, de los núcleos

periamigdaloide, de la corteza entorrinal lateral, de los ganglios basales telencefálicos y del núcleo basal magnocelular. Así mismo llega información específicamente de células noradrenérgicas provenientes del locus ceruleus y de información serotoninérgica del núcleo raphe (medio y dorsal) (Lledo 2008; Whitman and Greer 2009). Por lo tanto, la información que entra al BOA por estas fibras es muy importante en etapas tempranas del procesamiento de la información olfatoria (Lledo 2008).

Anatomía del Bulbo Olfatorio Accesorio

Los glomérulos del BOA están formados de igual forma que en el BOP, aunque poseen un menor tamaño. La proporción de axones que llegan a las células mitrales y empenachadas es de 1000:1 aproximadamente. La capa plexiforme externa es más pequeña que la del BOP, mientras que la capa mitral es más grande. Los axones colaterales que emergen de las células mitrales y empenachadas están en contacto con células mitrales adyacentes sugiriendo así una modulación lateral de la entrada de información (Larriva-Sahd 2008).

El BOA es una estructura lenticular delimitada rostral y medialmente por el BOP, caudalmente por el núcleo olfatorio anterior y centralmente por la sustancia blanca del núcleo bulbar. El BOA mide 1.8, 1.1 y 1 mm en el eje rostrocaudal, horizontal y vertical respectivamente (Larriva-Sahd 2008). Está compuesto por varios tipos celulares acomodados en capas: capa del nervio vomeronasal, capa glomerular, capa celular externa (ó capa mitral), tracto olfatorio lateral y capa celular interna (ó capa granular). La capa del nervio vomeronasal consiste de fibras nerviosas (axones) de los NOS localizadas en el OVN, los cuales hacen sinapsis con los glomérulos localizados en la capa glomerular. La capa celular externa está compuesta de las sinapsis dendrodentríticas formadas por las células mitrales y las interneuronas granulares. El tracto olfatorio lateral lo forman fibras provenientes del BOP que pasan entre el BOA separando la capa de células mitrales y los cuerpos celulares de las células granulares. La capa celular interna o capa granular consta de las fibras procedentes principalmente de las células granulares (Fig. 9) (Larriva-Sahd 2008).

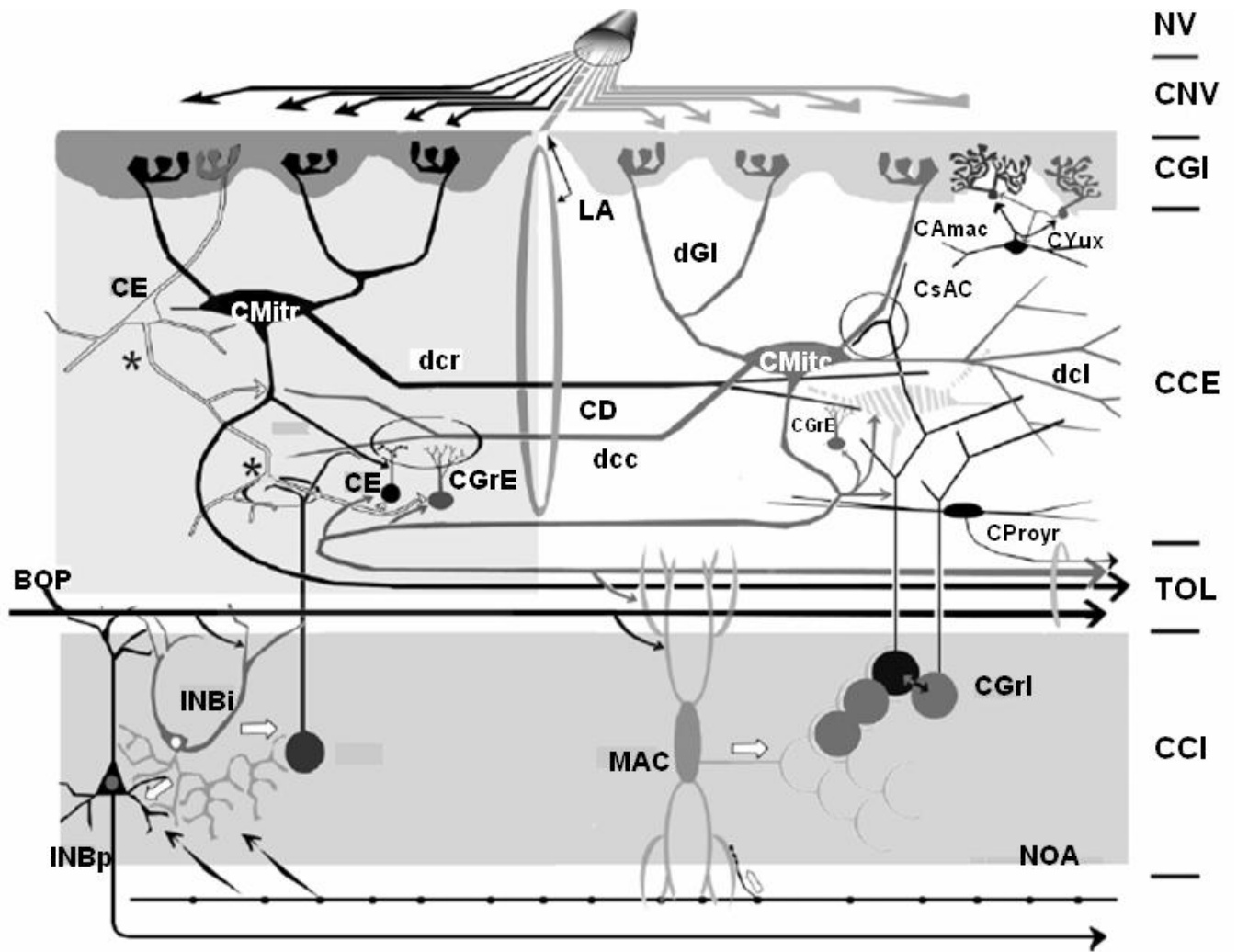


Figura 9. Circuitos neuronales y componentes del Bulbo Olfatorio Accesorio. NV- nervio vomeronasal, CNV- capa del nervio vomeronasal, CGI- capa glomerular, CCE- capa celular externa, TOL- tracto olfatorio lateral, CCI- capa celular interna, LA- línea alba, dGf- dendritas glomerulares, CAmac- células amadrinas, CYux- células yuxtglomerulares, CsAC- células superficiales de axón corto, CE- células empenachadas, CMitr- células mitrales rostrales, dcr- dendrita rostral comisural de las células principales, CD- comisura dendrítica, CMitc- células mitrales caudales, cGrE- células granulares externas, dcl- dendrita lateral comisural de las células principales, dcc- dendrita caudal comisural de las células principales, CE- células enanas, CProyr- célula de proyección redondeada, BOP- bulbo olfatorio principal, INBi- neurona intrínseca intersticial del bulbo, INBp- neurona de proyección intersticial del bulbo, MAC- célula accesoria principal, CGrl- célula granular interna, NOA- núcleo olfatorio anterior. *Tomado de(Larriva-Sahd 2008).*

Existe evidencia estructural y fisiológica que sugiere la presencia de un grupo particular de glomérulos que une la región anterior del BOA. Este conjunto de glomérulos se le conoce como el collar glomerular (NG, por sus siglas en inglés), y tiene diferencias fisiológicas y de conexiones con respecto al resto de los glomérulos del bulbo olfatorio. Estos glomérulos responden selectivamente a feromonas asociadas con los pezones de las madres. Al parecer, los NG adyacentes al BOA, reciben axones específicamente del GG en el vestíbulo nasal. Existe otro grupo de células especializadas que se localizan en la unión del BOA con el BOP, las INB. Las células INB constituyen a un grupo de neuronas de tipo piramidal y de axón corto diferentes a las presentes en BOA y BOP (Larriva-Sahd 2008).

El sistema olfatorio sufre una remodelación constante de sus circuitos por medio de la adición y reemplazo de nuevas neuronas, lo cual le permite ser un sistema capaz de responder a novedosas y complejas claves olfatorias, siendo éste un fenómeno ampliamente conservado entre especies (Lledo and Gheusi 2003; Lledo and Lazarini 2007). En el siguiente capítulo, hablaremos con más detalle del proceso de generación de nuevas neuronas que ocurre en el adulto, en particular en la región del bulbo olfatorio.

1.5 Plasticidad del Sistema Olfatorio

La mayoría de las neuronas nacen durante la etapa embrionaria y persisten durante toda la vida y durante mucho tiempo, en las neurociencias, se creyó que la capacidad germinal para generar neuronas estaba restringida al periodo embrionario (Pignatelli and Belluzzi 2010). Sin embargo, desde los estudios pioneros de Altman en los 60's (Altman 1962; Altman and Das 1965; Altman and Das 1965) el proceso de la neurogénesis adulta fue aceptada en una gran cantidad de mamíferos, así como en aves gracias a los trabajos de Fernando Nottebohm (Ming and Song ; Nottebohm 1989; Eriksson, Perfilieva et al. 1998; Nottebohm 2002; Lie, Song et al. 2004; Abrous, Koehl et al. 2005; Ming and Song 2005; Lledo, Alonso et al. 2006). La formación de nuevas neuronas en el adulto constituye un proceso muy organizado, las células progenitoras generan neuronas funcionales a través de pasos coordinados que se explicarán a continuación.

3. Neurogénesis en el Bulbo Olfatorio

3.1 Neurogénesis en el cerebro adulto

Durante la etapa embrionaria, las interneuronas del BO se derivan de precursores neuronales que migran de la eminencia ganglionar; sin embargo, durante la etapa adulta, las interneuronas del BO, derivan de precursores neuronales de la ZSV. En el cerebro adulto, existen dos regiones neurogénicas principales, la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo y la ZSV/sistema olfatorio. Sin embargo, la incorporación de nuevas neuronas en el cerebro adulto se ha reportado también en los tubérculos olfatorios, el núcleo olfatorio anterior, la tenia tecta, las islas de Calleja, la amígdala, el núcleo caudado y el núcleo acumbens, pero no se conoce aún de que nicho neurogénico provienen (Fig. 10) (Gould, Reeves et al. 1999; Kornack and Rakic 2001; Bernier, Bedard et al. 2002; Shapiro, Ng et al. 2009).

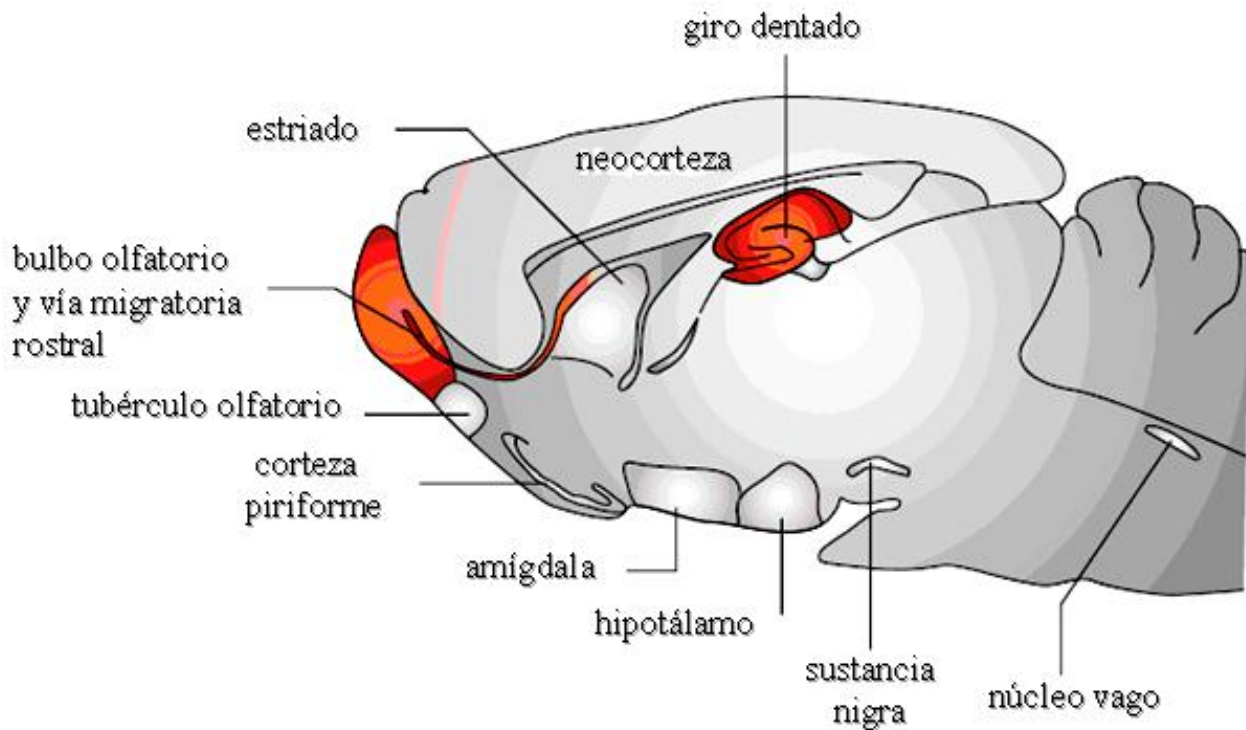


Figura 10. Regiones neurogénicas en el adulto. En la imagen se observan las principales regiones donde se ha observado la presencia de neuronas nuevas en el cerebro adulto, dentro de las cuales se observan las dos regiones neurogénicas más estudiadas (color rojo): bulbo olfatorio y giro dentado. (Imagen modificada de Gould 2007).

3.2 Neurogénesis en el Bulbo Olfatorio

En el BO del adulto se incorporan constantemente neuronas nuevas. La producción de las nuevas neuronas ocurre en la ZSV. Los neuroblastos que nacen en la ZSV migran una distancia relativamente larga hasta llegar al BO donde se dispersan y se diferencian en interneuronas. La ZSV del adulto también constituye un sitio de generación de oligodendrocitos (un tipo de célula glial), por lo que la ZSV posee precursores celulares neuronales y gliales. El sistema ZSV-BO incluye la proliferación de células, especificación y destino de los progenitores, migración celular, y diferenciación, sobrevivencia y muerte de las nuevas neuronas.

La diferenciación y destino de las células progenitoras está regulado por factores solubles, moléculas asociadas a la membrana y moléculas de matriz extracelular localizados en las propias células progenitoras y/o en las células vecinas (Watt and Hogan 2000; Fuchs, Tumber et al. 2004). El trasplante de células progenitoras de la ZSV de un ratón a la ZSV de otro ratón genera una gran cantidad de interneuronas que se incorporarán al BO (Lois and Alvarez-Buylla 1993). Sin embargo, si el trasplante de células de la ZSV se realiza en regiones no neurogénicas el resultado son la producción de pocas o ninguna neurona (Herrera, Garcia-Verdugo et al. 1999), lo que sugiere que las células de la ZSV dependen de las claves del microambiente local para diferenciarse en neuronas y sobrevivir (Seidenfaden, Desoeuvre et al. 2006).

A continuación hablaremos con más detalle de cada una de las etapas del proceso de neurogénesis del adulto: proliferación, migración e incorporación y sobrevivencia (Fig. 11).

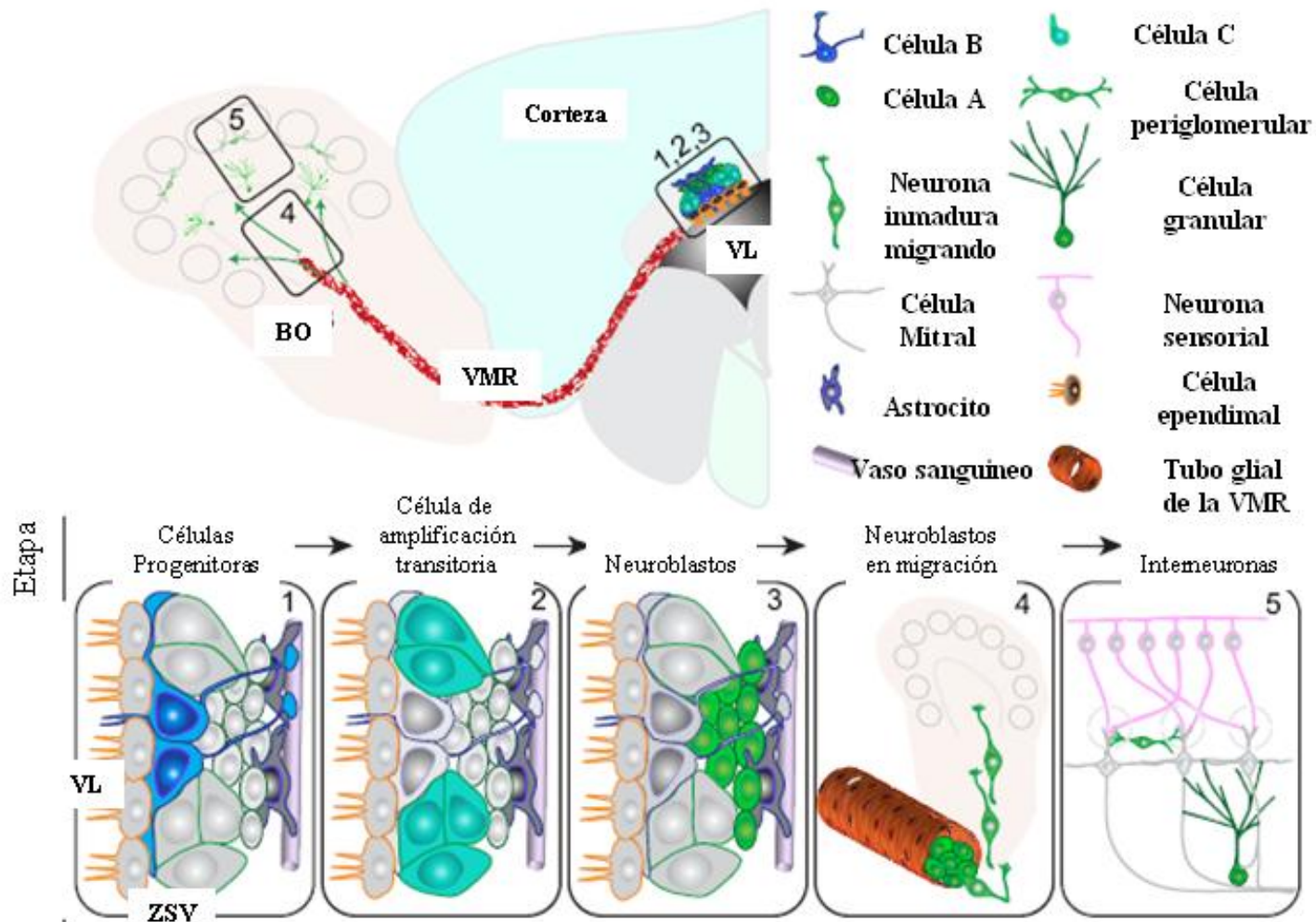


Figura 11. Proceso de neurogénesis del Bulbo Olfatorio. Resumen de las diferentes etapas del proceso de neurogénesis del BO: 1) activación de las células progenitoras (tipo-astrocitos) en la zona subventricular, 2) proliferación de las células de amplificación transitoria, 3) generación de los neuroblastos, 4) migración en cadena de los neuroblastos en la VMR (vía migratoria rostral) y en el BO, y 5) integración sináptica y periodos críticos de la supervivencia neuronal del BO. *Tomado de Ming y Song, 2011.*

Etapas del proceso de neurogénesis del Bulbo Olfatorio

Proliferación celular

La formación de nuevas neuronas depende de la proliferación de las células, y a su vez, la proliferación celular está regulada por el ciclo celular de cada una de las células madre.

Ciclo celular

El ciclo celular comienza cuando una nueva célula es creada a partir de una división mitótica. Las células pasan de un estado diploide (2N) en la fase G1, a la fase S de síntesis del material genético, en donde las células duplican su genoma hasta convertirse en célula tetraploides (4N). El estado 4N se mantiene durante la fase G2 hasta entrar en mitosis, donde se producirán dos células hijas idénticas, cada una con estado diploide (2N). Las células pueden madurar o volver a entrar a la fase G1 del ciclo celular y volver a dividirse por mitosis. El tiempo de cada ciclo celular varía dependiendo del tipo de célula, de la región donde la célula se localice y del momento en que la división celular ocurra. El tiempo que cada célula tarda en cada una de las fases del ciclo celular también varía.

El ciclo celular por el que pasan las células progenitoras de la ZSV y de la VMR varía haciéndose más lento conforme la región se acerque al BO. Además de esto, debido a que en la ZSV y la VMR constituyen un mosaico de células en proliferación que darán lugar a los diferentes tipos celulares del BO (Merkle, Mirzadeh et al. 2007; Whitman and Greer 2009) es difícil determinar el tiempo del ciclo celular de cada tipo en particular.

Proliferación celular en la Zona Subventricular y en la Vía Migratoria Rostral

Las neuronas nuevas destinadas al BO se producen en las paredes de los ventrículos laterales (ZSV) y a lo largo de la VMR (Lois and Alvarez-Buylla 1993; Lois and Alvarez-Buylla 1994; Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo 2002; Alonso, Ortega-Perez et al. 2008). Poco después del nacimiento en la etapa postnatal, la extensión rostral de los ventrículos laterales colapsa seguido de una maduración progresiva de la VMR. En esta VMR recién formada, los neuroblastos forman cadenas compactas, ayudados de tubos gliales formados por astrocitos. En

la VMR madura, los neuroblastos en migración permanecen mitóticamente activos, manteniendo propiedades de progenitores neurales (Lois, Garcia-Verdugo et al. 1996; Doetsch, Garcia-Verdugo et al. 1997; Peretto, Merighi et al. 1999; Alonso, Ortega-Perez et al. 2008).

La ZSV del roedor adulto está compuesta de cuatro tipos principales de células: células A, células B, células C y células endodiales (Doetsch, Garcia-Verdugo et al. 1997). Las células A corresponden a los neuroblastos; estas células se extiende a todo lo largo de los ventrículos laterales, a partir de donde comienzan a migrar a través de una red de vías interconectadas que convergen en la región anterior de la ZSV donde comienza a formarse la VMR. En la VMR, los neuroblastos migran tangencialmente hasta llegar al BO. En el BO, las células A se separan de las cadenas de la VMR para migrar radialmente hacia las capas del BO donde adquirirán su fenotipo de interneurona granular y periglomerular (Carleton, Rochefort et al. 2002; Petreanu and Alvarez-Buylla 2002).

Las cadenas de neuroblastos están rodeadas por astrocitos de la propia ZSV. Estos astrocitos son conocidos como células B (Lois, Garcia-Verdugo et al. 1996; Doetsch, Garcia-Verdugo et al. 1997), y además de ser elementos de soporte, algunas células B funcionan como células progenitoras (Doetsch and Alvarez-Buylla 1996). Las células B se originan a partir de la glía radial, que en el cerebro del embrión constituyen a los precursores neuronales (Merkle, Mirzadeh et al. 2007). Los astrocitos de la ZSV son componentes importantes del nicho celular, ya que se ha descrito que en cultivos de monocapas de astrocitos, las células precursoras de la ZSV son capaces de formar colonias de neuroblastos (Lim and Alvarez-Buylla 1999), por lo que al parecer el contacto entre astrocitos y células precursoras es muy importante para la proliferación celular.

En las cadenas formadas por las células A y las células B, se encuentran conjuntos de células inmaduras de división rápida, llamadas células C (Doetsch, Garcia-Verdugo et al. 1997). Las células C funcionan como intermediarios transitorios entre las células B y las células A. Por lo que, el proceso de generación de células nuevas en la ZSV ocurre de la siguiente manera: a partir de las células B (astrocitos), se generan las células C (intermediarios transitorios) hasta llegar a las células A (neuroblastos). De manera interesante, aunque las células tengan un papel

muy específico dentro del nicho, pueden ser reprogramadas de acuerdo a las condiciones microambientales que se les proporcione. Cuando las células C son aisladas in vitro pueden funcionar como células B y adquirir las propiedades de célula progenitora (Doetsch, Caille et al. 1999).

Migración celular

Después del nacimiento de las nuevas células en la ZSV y en la VMR, éstas se organizan de forma compacta formando cadenas que les permitirá migrar hasta el BO. Los neuroblastos migran tangencialmente a través de la VMR en cadenas de células, asociadas fuertemente a astrocitos y otros tipos de células gliales, que funcionan también como barrera física que delimita la VMR. Una vez que las células llegan al BO, los neuroblastos se liberan de las cadenas de la VMR y comienzan a migrar radialmente hasta alcanzar su posición final en las capas glomerular o granular del BO.

La migración de las células en la VMR no es constante, aunque en general la velocidad de migración es de aproximadamente 70 a 80 μm por hora. La migración de las células está asociada fuertemente a los vasos sanguíneos (Bovetti, Peretto et al. 2007; Snappyan, Lemasson et al. 2009; Whitman and Greer 2009), y al flujo del líquido cefalorraquídeo, aunque no son los únicos factores que la regulan. Las claves secretadas a larga distancia, desde el BO no son determinantes para la migración de las células, ya que la remoción del BO no afecta la generación ni la migración de las nuevas células en la ZSV y en la VMR. Sin embargo, al no existir el destino final de las células nuevas (el BO) éstas se acumulan en la VMR y tras algunos meses se incrementa la muerte celular (Whitman and Greer 2009).

Una vez que los neuroblastos han llegado al BO, alcanzan su posición final y comienzan su maduración. Las nuevas neuronas se incorporarán como interneuronas del BO: células granulares y células periglomerulares. Después de 1 mes, aproximadamente la mitad de las nuevas neuronas formadas se han eliminado mientras que la otra mitad se ha integrado de manera duradera en el BO (Petreanu and Alvarez-Buylla 2002; Winner, Cooper-Kuhn et al. 2002).

Incorporación y Supervivencia de las nuevas neuronas en el Bulbo Olfatorio

Cuando las neuronas nuevas entran al BO, las cadenas de células se liberan de la VMR y comienzan a migrar individualmente hacia la capa granular y glomerular. Se ha propuesto que las moléculas reelina y tenascina-R guían y regulan el cambio de migración tangencial a migración radial. La molécula Slit también juega un papel en este proceso, ya que en estudios in vitro, la ausencia de Slit1 provoca una disminución en la migración en cadena de células, y por el contrario, la expresión de Slit disminuye conforme la migración cambie de tangencial a radial (Nguyen-Ba-Charvet, Picard-Riera et al. 2004). La reelina, renascina-R y Slit1 se expresan a lo largo del eje rostro-caudal del BO de manera uniforme.

Diferenciación celular

Las neuronas nuevas pasan por cinco etapas de maduración para pasar de neuroblastos (neuronas inmaduras) hasta convertirse en neuronas maduras y funcionales dentro del BO (Petreanu and Alvarez-Buylla 2002; Kosaka and Kosaka 2005).

La etapa 1 ocurre durante la migración tangencial de las células en la VMR, del día 2 al 7 a partir de su generación, y es en esta etapa cuando los neuroblastos presentan la morfología más simple, con un proceso dendrítico que guía al neuroblasto. En los primeros días de ésta etapa, que corresponde a la etapa de proliferación, se puede encontrar expresión de proteínas como GFAP que estarán presentes en células progenitoras (“astrocyte-like progenitors”), así como de Dlx2 presentes en células en proliferación, que aún no adquieren un compromiso de linaje celular, entre otros. Así mismo en esta etapa 1, pero días después que correspondería a la etapa de diferenciación celular, las células nuevas comienzan a expresar proteínas presentes en los microtúbulos de los procesos inmaduros, como DCX (doblecortina) en las células recién comprometidas a neuronas y PSA-NCAM (proteínas de adhesión NCAM), expresadas por todas las células en migración, entre otros (Ming and Song 2005). En la etapa 2, en los días 5 a 7, los neuroblastos comienzan a migrar radialmente dentro del BO, manteniendo aún la morfología simple. En la etapa 3, entre los días 9 a 13, los neuroblastos ya llegaron en su mayoría a su destino final, por lo que dejan de migrar. En esta etapa, los neuroblastos tienen una dendrita simple que ya se encuentra extendida en la capa mitral. Durante las etapas 2 y 3, las células

nuevas en migración continuarán expresando proteínas tales como PSA-NCAM y DCX (Ming and Song 2005). La etapa 4 que se presenta entre el día 11 y 22, los neuroblastos poseen un árbol dendrítico extenso, pero aún no tienen espinas dendríticas; sin embargo, en la etapa 5, que ocurre entre el día 15 y 30, las células nuevas pasan de ser neuroblastos a neuronas con morfología madura y ya poseen espinas dendríticas (Petreanu and Alvarez-Buylla 2002; Whitman and Greer 2009). Desde la etapa 4 y en la etapa 5, las células nuevas al mismo tiempo que adquieren una morfología madura, comienzan a expresar proteínas específicas de linaje neuronal o glial, como NeuN (proteína expresada por neuronas maduras), calretinina y calbindina (CalR y CalB, proteínas acarreadoras de calcio que expresan un tipo neuronal particular), TH (tirosina hidroxilasa, expresada por neuronas dopaminérgicas), GFAP (expresada por células gliales de tipo astrocito), entre otras (Ming and Song 2005).

La madurez fisiológica es diferente, durante las etapas 1 y 2, los neuroblastos en migración poseen propiedades de membrana similares a los precursores neuronales inmaduros, por lo que no muestran corrientes postsinápticas espontáneas. Las células de las etapas 3 a la 5 muestran corrientes postsinápticas espontáneas tanto excitatorias como inhibitorias, sin embargo, únicamente las células en etapas más maduras muestran potenciales de acción. Cuando las neuronas nuevas granulares y periglomerulares están en la etapa 5, las respuestas electrofisiológicas son totalmente maduras e incluso indistinguibles con respecto a las neuronas preexistentes del BO (Fig. 12) (Petreanu and Alvarez-Buylla 2002; Belluzzi, Benedusi et al. 2003).

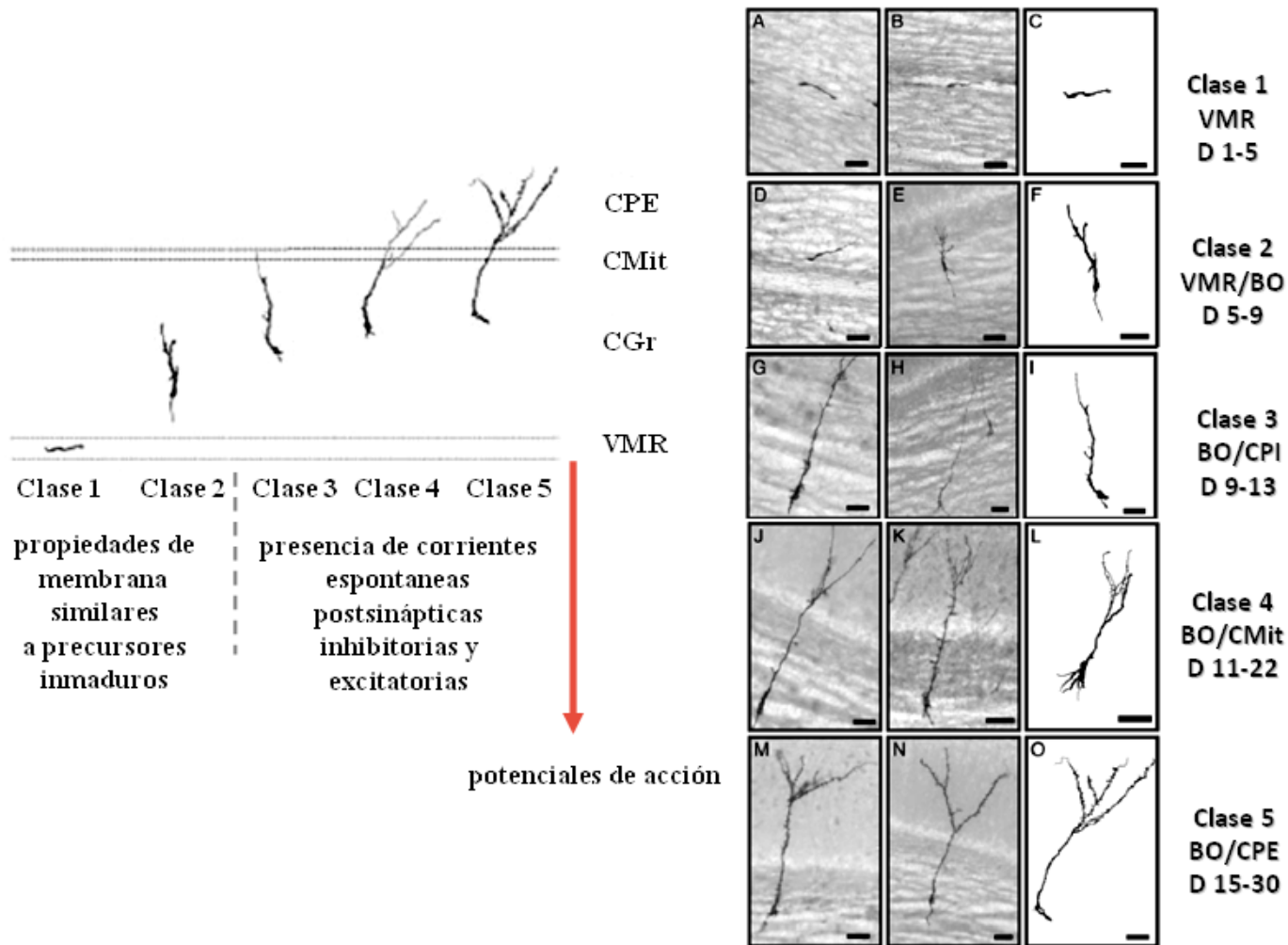


Figura 12. Maduración de las nuevas neuronas granulares del BOP. Del lado izquierdo se observa un esquema ilustrativo de las etapas de maduración de las neuronas granulares (clase 1 a clase 5) y su localización dentro de las capas celulares del BOP. Las neuronas granulares de la clase 1 y 2 muestran propiedades de precursores y las clase 3 a 5 neuronas con corrientes espontáneas y al finalizar su maduración poder presentar potenciales de acción. Del lado derecho se muestran neuronas granulares en las diferentes fases de maduración: clase 1 (A-C); clase 2 (D-F); clase 3 (G-I); clase 4 (J-L), y clase 5 (M-O) en tres columnas, siendo las primeras dos fotomicrografías de neuronas granulares teñidas con fosfatasa alcalina y la última columna corresponde a dibujos con cámara lúcida. *Modificada de Petreanu y Alvarez-Buylla 2002.*

Los diferentes tipos de interneuronas que se incorporan al BO en el adulto provienen de regiones específicas de la ZSV y de la VMR (Merkle, Mirzadeh et al. 2007; Young, Merson et al. 2007). En los roedores, la mayoría de las células granulares expresan el neurotransmisor inhibitorio por excelencia, GABA. De las células periglomerulares cerca del 40% son también GABAérgicas, mientras que el 60% expresan dopamina, aunque algunas de éstas células periglomerulares son subclasificadas a su vez por la expresión de calbindina, calretinina ó ácido glutámico descarboxilasa (GAD, por sus siglas en inglés) (Fig. 13).

La expresión del factor de transcripción Pax6 es importante para promover la neurogénesis de la ZSV y dirigir la generación de células dopaminérgicas dentro de la población de células periglomerulares, ya que la inhibición de Pax6 resulta en una severa reducción de células periglomerulares dopaminérgicas (Hack, Saghatelian et al. 2005). Las células periglomerulares no-dopaminérgicas, por otro lado, parecen estar determinadas por el factor de transcripción Sp8, ya que neuroblastos que no expresan Sp8 incrementan la expresión de Pax6. Esta explicación se ve apoyada por el hecho de que las células precursoras de la RMS muestran una mayor expresión de Pax6 que el BO, convirtiendo así a Pax6 y a Sp8 en un código transcripcional importante para la especificación del fenotipo de las células periglomerulares.

Las diferentes subpoblaciones de las células granulares, se pueden distinguir por su localización dentro de la capa granular. Las células granulares profundas se localizan próximas al núcleo del BO, mientras que las células granulares superficiales se localizan junto a la capa de células mitrales. El factor de transcripción Pax6 parece también tener un papel en la determinación del fenotipo de las células granulares, ya que los progenitores embrionarios nulos para la expresión de Pax6 no generan células granulares superficiales. Emx1, es otro factor de transcripción que se expresa en las células que expresarán calretinina, GAD, células granulares superficiales y células periglomerulares. Como Emx1 se expresa en su mayoría en el palium en desarrollo y no en la eminencia ganglionar lateral, que es el origen de la ZSV, se sugiere que diferentes regiones anatómicas contribuyen a la especificación de los diferentes subtipos de interneuronas del BO. En resumen, la especificación de la diversidad de interneuronas del BO que son generadas en el animal adulto es el resultado de la combinación de códigos transcripcionales complejos (Taupin 2006).

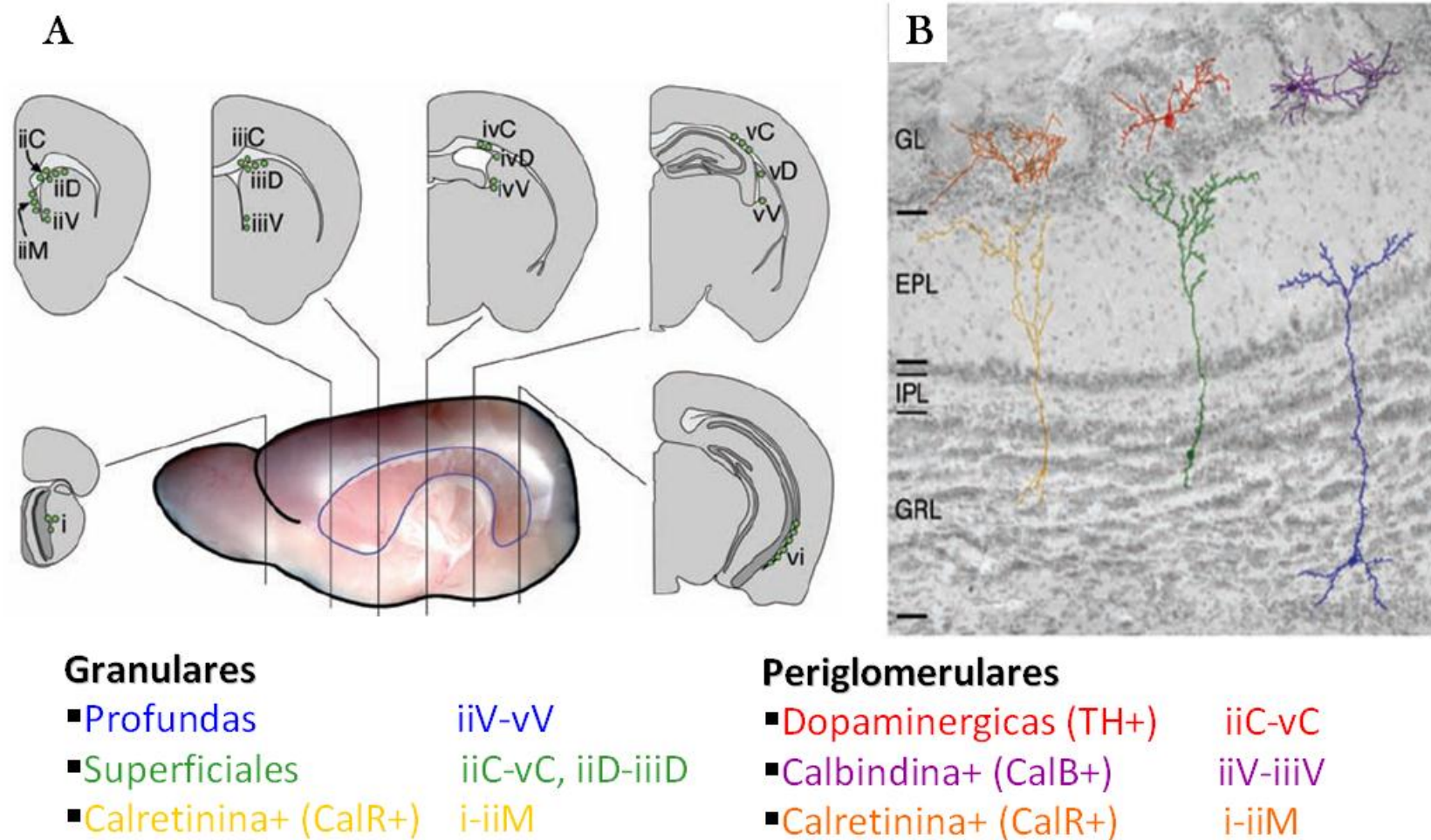


Figura 13. Sitios de generación de los diferentes tipos de interneuronas granulares y periglomerulares en el adulto. A) Secciones a lo largo de la ZSV y VMR donde células nuevas se encuentran proliferando y a partir de donde comienzan a migrar el resto de la vía para llegar a su destino en el BO. B) Regiones donde se ubican en las capas que les corresponderá, madurando e integrándose como granulares profundas, superficiales o calretinina+ en la capa granular, ó dopaminérgicas, calbindina ó calretinina+ en la capa glomerular. Modificada de Merkle y cols. (2007).

Muerte celular y supervivencia

El pico máximo de generación de células que llegan al BO ocurre en el día 15, por lo que a partir de éste día y hasta el día 45, aproximadamente el 50% de las nuevas neuronas mueren, y las neuronas que sobrevivan a éste periodo crítico pueden sobrevivir hasta por un año. Aún no se conocen con detalle los procesos que regulan la supervivencia de las neuronas, sin embargo se sabe que la actividad juega un papel importante. La exposición a una gran variedad de olores (el enriquecimiento olfatorio), a través del aumento en la actividad del BO, incrementa la supervivencia de las nuevas neuronas del BO (Rocheffort, Gheusi et al. 2002), mientras que la oclusión de las narinas del animal adulto disminuye significativamente la supervivencia de las nuevas neuronas granulares (Mandairon, Jourdan et al. 2003). La destrucción del EOP disminuye la supervivencia neuronal del BO, posiblemente a través de una regulación a la baja de la fosforilación de CREB, ya que ratones transgénicos con ausencia de CREB muestran una supervivencia reducida de las nuevas neuronas (Giachino, De Marchis et al. 2005).

La supervivencia neuronal se ve afectada en particular entre los días 14 y 28 después de nacidas, ya que es el momento cuando las nuevas neuronas se encuentran diferenciándose e integrándose al circuito (Yamaguchi and Mori 2005). El aprendizaje olfatorio también tiene una influencia importante en la supervivencia de las nuevas neuronas que llegan al BO. El aprendizaje de una tarea de discriminación olfatoria durante el período crítico de supervivencia celular (15-45 días) incrementan las nuevas neuronas granulares del BO del ratón. De manera interesante, una simple exposición a olores sin un aprendizaje no promueve un incremento en la supervivencia del BO (Alonso, Viollet et al. 2006).

Integración sináptica

Los neuroblastos en todas las etapas de maduración, expresan receptores funcionales para GABA (Belluzzi, Benedusi et al. 2003; Carleton, Petreanu et al. 2003). Las neuronas periglomerulares, sólo son capaces de responder a glutamato. Una pequeña proporción de las nuevas neuronas periglomerulares presentan corrientes sinápticas espontáneas excitatorias, y la gran mayoría responde a la estimulación del nervio olfatorio (Belluzzi, Benedusi et al. 2003).

Por otro lado, las neuronas granulares se integran sinápticamente en dos etapas: en la primera etapa las neuronas granulares de 10 días de nacidas, reciben sinápsis axodendríticas de las fibras centrífugas que entran al BO o de las dendritas basales de las neuronas mitrales o empenachadas. En la segunda etapa, que comienza aproximadamente a los 21 días, las neuronas granulares reciben sinápsis dendrodendríticas recíprocas (Sinchak, Dewing et al. 2007). Los contactos sinápticos formados se vuelven funcionales entre las semanas 4 y 6 de vida de las nuevas neuronas. A pesar de que la incorporación de nuevas neuronas a los circuitos del BO incrementa la formación de nuevas sinapsis, el número total de contactos inhibitorios que las células mitrales reciben se mantiene constante, así como las propiedades fisiológicas de las señales postsinápticas. Por lo tanto, los nuevos contactos GABAérgicos formados por las nuevas neuronas granulares son capaces de sustituir rápidamente otros contactos inhibitorios sin alterar el funcionamiento general del circuito (Bardy, Alonso et al. 2010).

3.3 Herramientas experimentales destinadas al estudio de proliferación celular y neurogénesis

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, Sivalingam et al. 2002; Ming and 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 and Gross 2002).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La cópula regulada es una conducta fundamental para la reproducción en la rata hembra (McClintock and Adler 1978). El procesamiento de olores quimiosensoriales sexualmente relevantes y la integridad del BO son fundamentales para el despliegue y mantenimiento de esta conducta (Keller, Baum et al. 2009; Kelliher and Wersinger 2009). En hamsters macho, el mayor porcentaje de las células nuevas que se incorporan al BOP y al BOA se activan como respuesta a la cópula, así mismo, las células nuevas se activan en un menor porcentaje como respuesta a la exposición a secreciones de hembras en estro o a la exposición a una hembra (sin contacto físico) (Huang and Bittman 2002). Estos resultados sugieren que las células generadas en el adulto responden a la conducta sexual y a estímulos olfatorios sexuales. En ratonas hembras, la exposición a feromonas de la orina de machos incrementa la proliferación de células en la ZSV, y aumenta el número de células nuevas en el BO de las hembras (Mak, Enwere et al. 2007). La inducción del estado de estro por olores sexualmente relevantes, en perros de la pradera hembras, promueve un incremento en la proliferación celular de la ZSV (Smith, Pencea et al. 2001). En ratas hembra, la preñez y el estado de estro incrementa la proliferación celular de la VMR (Paredes-Ramos, Miquel et al. 2012). Estos resultados sugieren entonces, que los estímulos olfatorios sexualmente relevantes, y la conducta sexual pueden incrementar la proliferación celular de la ZSV y de la VMR, así como la incorporación de células al BO. En nuestro grupo hemos demostrado recientemente que la cópula regulada por la rata hembra de manera repetida incrementa la incorporación de células nuevas en el BOP y en el BOA (Hurtazo and Paredes 2005). Así mismo, la conducta sexual en machos, cuando estos regulan los contactos con la hembra, promueve un incremento en la incorporación celular en el BOA (Portillo, Unda et al. 2012). Estos efectos se observaron 15 días después de realizada la conducta, por lo que, con base en estos antecedentes nos planteamos dos preguntas que evaluaremos a través de experimentos independientes. En el primer experimento nos preguntamos si el primer contacto sexual regulado por la hembra incrementa la proliferación celular en la ZSV y en la VMR. En el segundo experimento nos preguntamos si el primer contacto sexual regulado por la hembra incrementa la incorporación de nuevas células al BO y la supervivencia de las mismas. Así mismo, en el segundo experimento nos preguntamos también si las células nuevas responden a estímulos olfatorios sexuales y a la conducta sexual.

IV. HIPÓTESIS GENERALES

1. La cópula regulada, como un estímulo, incrementará la proliferación celular en la zona subventricular del cerebro de ratas hembra adultas.
2. La cópula regulada, como un estímulo, incrementará la proliferación celular en la vía migratoria rostral del cerebro de ratas hembra adultas.
3. La cópula regulada, como un estímulo, incrementará la supervivencia de las nuevas células en el bulbo olfatorio accesorio del cerebro de ratas hembra adultas.

V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la cópula regulada sobre la proliferación celular de la zona subventricular y de la vía migratoria rostral, así como en la supervivencia celular del bulbo olfatorio principal y accesorio.

VI. MATERIAL Y MÉTODO GENERAL

1. Sujetos

Se utilizaron ratas hembra adultas (230-270gr.) de la cepa *Wistar*, las cuales se mantuvieron en un bioterio exclusivo de hembras, bajo condiciones de ciclo luz invertido (12 hrs luz – 12 hrs oscuridad; la luz se encendía a las 22:00 hrs). Las hembras permanecieron con acceso libre al alimento y agua (Lab Diet Feed PMI, USA. No. 5008). Para el control de la receptividad sexual, las hembras fueron ovariectomizadas bajo anestesia (xilazina 30%-ketamina 70% 1ml/kg) (xilazina: Procin, PiSA A099884 y ketamina: Cheminova salud animal KTCHH11L05). Todas las hembras carecían de experiencia sexual previa a la cirugía. Las hembras realizaron las pruebas conductuales correspondientes una semana después de la ovariectomía. Todos los machos (*Wistar* entre 300-350gr) que se utilizaron para las pruebas conductuales como animales estímulo eran sexualmente expertos.

2. Tratamiento hormonal

Para inducir la receptividad sexual de las hembras, se les administraron mediante inyecciones subcutáneas benzoato de estradiol y progesterona en un volumen total de 0.2ml/rata. El benzoato de estradiol (BE, 25µg/rata; 3-Benzoato de β-Estradiol Sigma Aldrich, E-8515) se administró 2 días antes de la prueba conductual, mientras que la progesterona (1mg/rata; Progesterona Sigma Aldrich, P0130-25G) se administró 4 horas antes de la prueba conductual. Las inyecciones siempre se administraron a la misma hora (9-10 am) (Fig.14).

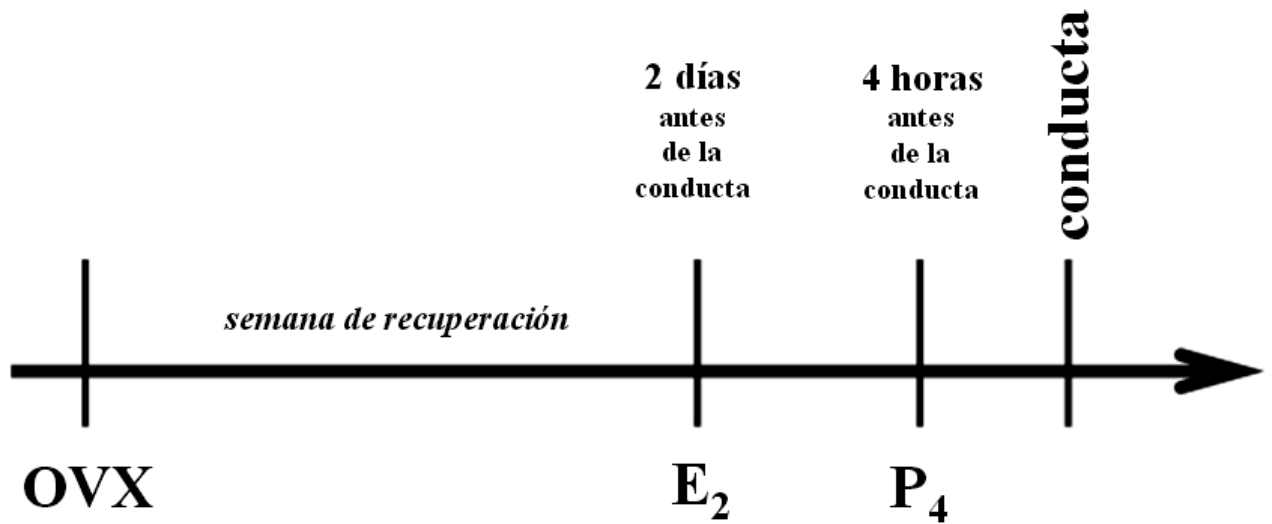


Figura 14. Esquema de la inducción de la receptividad sexual. Las hembras se ovariectomizaron (ovx) y se dejaron una semana para recuperación. Posteriormente se administraron las hormonas estradiol (E₂) y progesterona (P₄) 2 días y 4 horas respectivamente antes de realizar la conducta.

3. Administración del marcador 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 (Fig.15) y es utilizado para el marcaje del nacimiento celular y proliferación, ya que es un indicador de síntesis de ADN.

HALOPIRIMIDINA

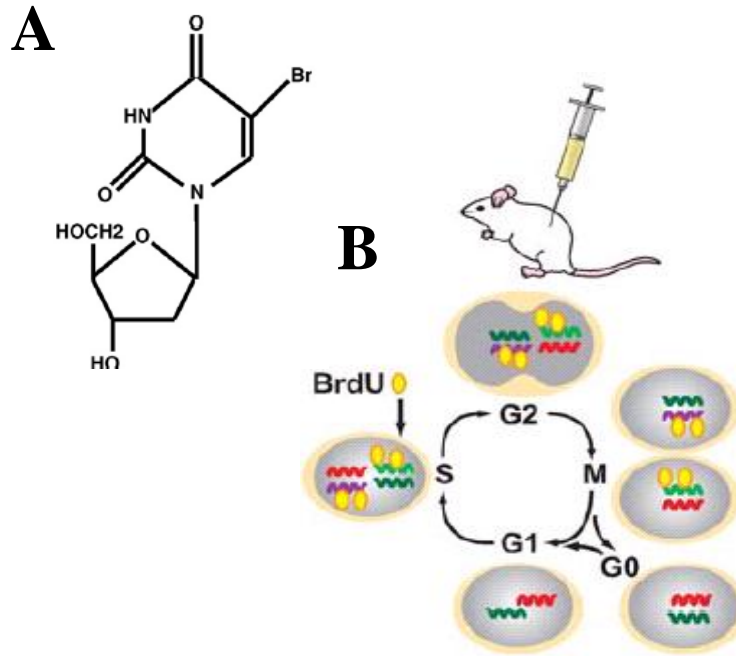


Figura 15. Estructura química del BrdU. El BrdU es una halopirimidina que se incorpora al ADN en la fase S (síntesis) del ciclo celular. (Imágenes modificadas de A- (Taupin 2007) y B- (Ming and Song 2005).

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; Taupin 2006; 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, por lo que se puede administrar en forma intracerebroventricular, intraperitoneal, intravenosa y 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; Taupin 2006; Taupin 2006; Taupin 2007).

Por lo tanto, para los dos experimentos que se realizaron en este trabajo, el BrdU (5'-Bromo-2'-deoxyuridina) (Sigma Aldrich, B5002-5G), se administró mediante inyecciones intraperitoneales en una concentración de 100mg/kg en 0.9% NaCl, por cada inyección. En total se realizaron tres inyecciones (300mg/kg total): la primera dosis 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 como se observa en la Fig.16.

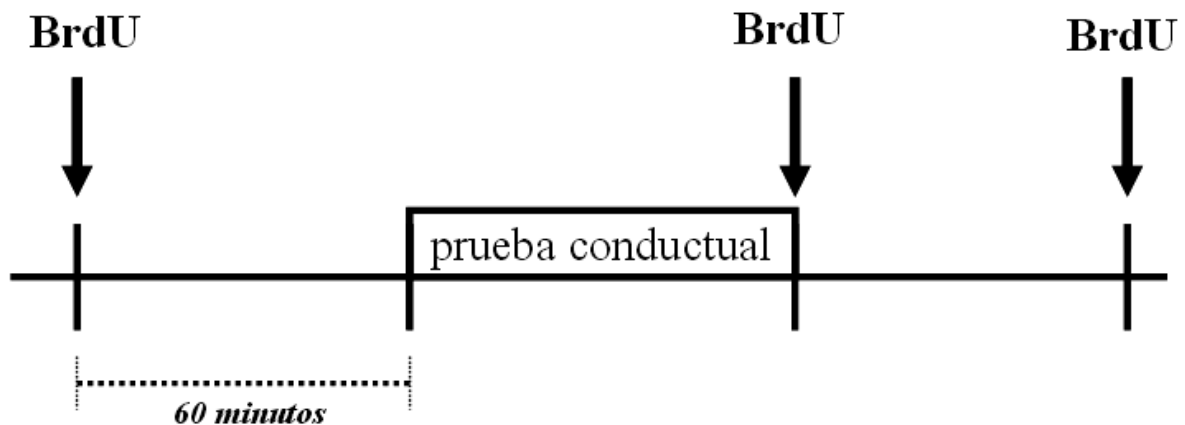


Figura 16. Diseño experimental y administración de BrdU. El BrdU se administró tres veces mediante inyecciones intraperitoneales, cada dosis de 100mg/kg, para ser en total 300mg/kg con el siguiente esquema: la primera dosis 60 minutos antes de comenzar la prueba conductual, la segunda dosis al término de la prueba conductual y la tercera dosis 60 minutos después de finalizada la conducta.

4. Diseño experimental

Para poder evaluar los objetivos planteados, se diseñaron dos experimentos; cada uno de ellos nos permitirá conocer el efecto de la cópula regulada en las fases de proliferación y supervivencia celular, respectivamente. Para ambos experimentos se utilizaron los mismos aparatos y la misma distribución de grupos experimentales que a continuación se describen.

4.1 Aparatos

Para todas las pruebas conductuales se utilizaron cajas especiales que permitieran la observación de la cópula. Estas cajas están hechas de acrílico y tienen las siguientes dimensiones: 62cm de ancho, 29cm de altura y 42cm de profundidad. El fondo de la caja permaneció cubierto con aserrín limpio (cambiado para cada prueba). Las cajas se lavaron antes de cada prueba con agua y jabón, y posteriormente se limpiaron con una gasa impregnada con ácido acético 10%.

4.2 Grupos Experimentales

Para cada uno de los experimentos, las ratas se dividieron aleatoriamente en cinco grupos que a continuación se describirán con mayor detalle y que son 1) el grupo control, 2) el grupo expuesto al olor de acetato de amilo, 3) el grupo expuesto a machos sexualmente expertos, 4) el grupo de cópula regulada y 5) el grupo de cópula no regulada.

Grupo 1. Control

En este grupo, las ratas permanecieron en la caja de cópula (Fig. 17) la cual permaneció libre de olores; el aserrín que se utilizó para esta prueba fue esterilizado y renovado para cada sujeto ya que lo que se buscó en esta prueba fue que las ratas no recibieran ningún tipo de estímulo olfatorio sexualmente relevante durante 60 minutos.

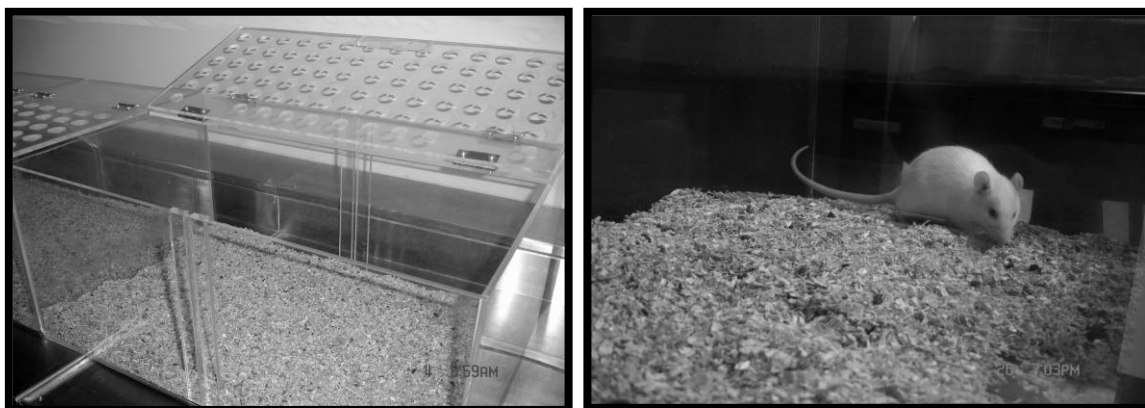


Figura 17. Grupo control. Izquierda- Caja de cópula utilizada para el grupo control. Derecha- hembra control en la caja.

Grupo 2. Exposición a acetato de amilo (C7H14O2)

Las ratas de este grupo permanecieron, durante 60 minutos, en uno de los compartimientos de la caja de cópula con una separación de acrílico que divide la caja en dos compartimientos (Fig.18). En el otro compartimiento, se colocó adherido a la separación de acrílico, coincidiendo con uno de los orificios (como se muestra en la figura 31 y señalado con una flecha) una caja que contenía un filtro humedecido con acetato de amilo (Sigma Aldrich, W50400-9) al 10% (aceite de plátano). La separación de acrílico con orificios de 1cm de

diámetro, permitió a las hembras estar expuestas durante una hora a este olor, siendo volátil y no volátil, debido a que la hembra tuvo la oportunidad de pegar sus narinas al filtro contenido en la caja para estar en contacto directo con las moléculas químicas u olerlo a distancia.



Figura 18. Grupo exposición a acetato de amilo. Izquierda - caja de cópula para estímulos olfatorios en donde se observa en el sitio donde está la flecha un papel filtro al que se le aplicaron 500 μ l de acetato de amilo (10%). Derecha - prueba de estímulo olfatorio, en donde se observa a la hembra olfateando el filtro que contiene el olor (señalado por una flecha).

Grupo 3. Exposición a un macho

Las ratas de este grupo permanecieron durante 60 minutos, en uno de los compartimientos de la caja de cópula con una separación de acrílico que divide la caja en dos compartimientos (Fig. 19). Los machos se colocaron en el otro compartimiento donde no estaba la hembra. Esta separación de acrílico con orificios de 1cm de diámetro, permitió a las hembras estar expuestas a un macho sexualmente experto, pudiendo recibir estimulación olfatoria, visual y auditiva, pero sin contacto físico entre ellos.



Figura 19. Grupo exposición a un macho. Izquierda - caja de cópula para estímulos olfatorios y visuales. Derecha - 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 4. Cópula regulada (pacing)

Las hembras de este grupo regularon los contactos sexuales que tuvieron con los machos. Las hembras se colocaron en la caja de cópula con una división que genera dos compartimentos (Fig. 20). Ésta división posee un orificio de 7 cm de altura y 4 cm de ancho, el cual únicamente puede ser atravesado por las hembras al tener un menor tamaño que el macho. Esto permite a la hembra regular y espaciar los contactos copulatorios. Las ratas permanecieron en la caja durante 60 minutos; los machos y las hembras fueron colocados en distintos compartimientos al inicio de la prueba.

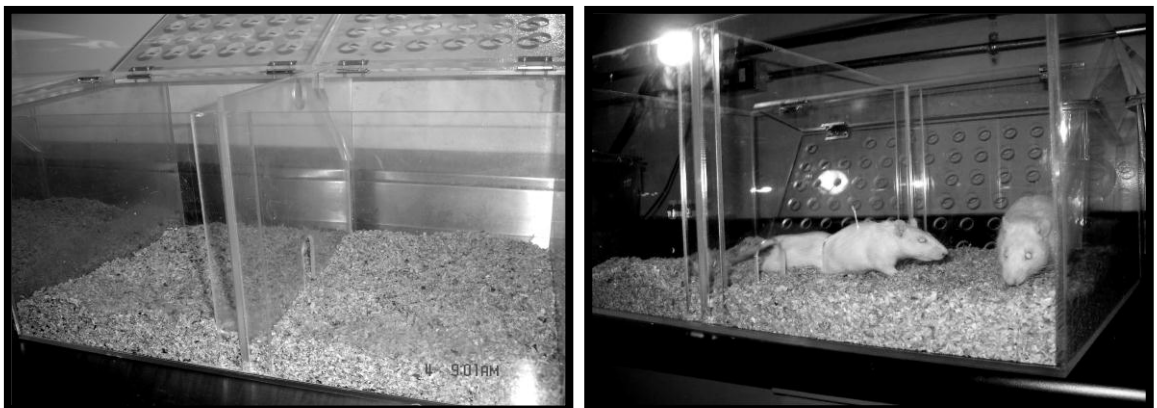


Figura 20. Grupo cópula regulada. Izquierda - caja de cópula regulada por la hembra (*pacing*). Derecha - prueba de cópula regulada en la que se puede apreciar la división con el orificio que permite a la hembra moverse hacia el compartimiento donde se encuentra el macho.

Grupo 5. Cópula no regulada

La cópula en este grupo es regulada por el macho. Estas ratas se colocaron en la caja de cópula (Fig. 21) sin la división de acrílico junto con los machos, donde permanecieron 60 minutos.



Figura 21. Grupo cópula no regulada. Izquierda - caja de cópula regulada por el macho. Derecha - prueba de cópula donde se observa una interacción entre hembra y macho, en la cual el macho ha regulado los contactos copulatorios.

4.3 Registro de conducta sexual

La actividad sexual de las ratas hembras se registró en los grupos de cópula regulada y cópula no regulada 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:

Número y latencia de montas, intromisiones y eyaculaciones

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

Para cada uno de éstos parámetros se tomó en cuenta el grado de receptividad de las hembras, medidos por 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 [Modificado de la clasificación de Hardy y deBold (1972)].

Para analizar el grado de receptividad que las hembras tenían al momento de la cópula, se calcularon los siguientes índices con los datos recabados previamente:

Coeficiente de Lordosis (CL): éste coeficiente se obtiene sumando el número de lordosis (ΣL) presentadas dividido entre la suma del total de número de montas (ΣM) más la suma del total de número de intromisiones (ΣI) que recibió del macho, todo multiplicado por 100.

$$CL = \Sigma L / (\Sigma M + \Sigma I) * 100$$

Intensidad Media de Lordosis (IML): la intensidad se obtiene con la sumatoria del grado de lordosis presentada (Σ Ptos L) dividido entre el número total de lordosis (ΣL) presentada.

$$IML = \Sigma \text{ Ptos L} / \Sigma L$$

5. Sacrificio de los sujetos

Las ratas se sacrificaron 2 días ó 45 días después de la administración del marcador BrdU. El sacrificio se realizó mediante perfusión vía intracardiaca con paraformaldehido (PF) 4% (Sigma Aldrich, P-6148), previamente anestesiadas con pentobarbital sódico (1ml/rata; Cheminova salud animal) (Cheminova, México DF). Una vez perfundidas, se extrajo el cerebro y se colocó en PF durante 1 hora.

6. Histología

Al término de la hora, se cambiaron a una solución de sacarosa 30% para donde permanecieron hasta ser cortados. Posteriormente se realizaron cortes sagitales del hemisferio

derecho de 30 μm de grosor en el microtomo de congelación (Leica, SM2000R). Se obtuvieron cortes sagitales seriados, de entre los cuales se seleccionó cada tercer corte partiendo del nivel donde aparecen las zonas de interés (ZSV, VMR y BO), siendo en total 5 cortes, sobre los cuales se realizó la inmunodetección de BrdU. Todas las tinciones por inmunohistoquímica se realizaron con los cortes en flotación.

7. Detección e identificación de células nuevas mediante Inmunohistoquímica

A continuación se describen los protocolos base de las inmunohistoquímicas utilizadas para identificar a las células de interés. Como se observa en la Tabla 1, se utilizaron varios anticuerpos con el fin de identificar a las células nuevas en las diferentes etapas de maduración.

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en ambos experimentos. En esta tabla se especifican los anticuerpos que se utilizaron para ambos experimentos, el tipo de células que marca cada uno de ellos y la localización del marcaje dentro de la célula.

Anticuerpo	Tipo celular que lo expresa	Localización del marcaje
BrdU	célula nueva	Núcleo
DCX	neurona inmadura	Citoplasma
NeuN	neurona madura	núcleo/citoplasma
MAP-2b	neurona madura	Citoplasma
cFos	activación celular	Núcleo
GFAP	progenitor celular (etapa temprana)/ célula glial-astrocito (etapa madura)	Citoplasma

7.1 Protocolo General para Inmunohistoquímica revelada con DAB

Para cada uno de los lavados e incubaciones realizadas los tejidos se mantuvieron en constante agitación. Se lavaron en una solución amortiguadora de fosfatos (TBS: Tris Hidroclorídrico, Tris (Base) y Cloruro de Sodio; J.T. Baker, 4103-01, 4109-01 y 3629-05, respectivamente) (3 lavados de 10 min c/u), para después permeabilizar las membranas celulares con lavados de borohidrato de sodio (0.5%; Sigma Aldrich, 452882-100G) (1 lavado de 15 min),

Tritón 10X (1%; J.T. Baker, X198-07) y H₂O₂ (1%; Peróxido de Hidrógeno, J.T. Baker, 2189-01) (1 lavado de 30 min) y DMSO (1%; Dimetilsulfóxido, J.T. Baker, 9224-01) (1 lavado de 10 min). Los tejidos se incubaron en 2N HCL (Ácido Clorhídrico 2N, J.T. Baker, 5616-02) a 37 C durante 60 minutos para abrir los núcleos celulares y permitir la incorporación posterior del anticuerpo. El bloqueo de sitios inespecíficos se realizó incubando los tejidos durante 30 min con albúmina 0.1% (10%) y Tritón 10X (0.3%). Los tejidos se incubaron con el anticuerpo primario (ver tabla de anticuerpos para cada experimento) durante 48 horas a 4° C en una solución de albúmina 0.1% (1%; Albúmina Bovina, Sigma Aldrich, A-91418) y Tritón 10X (0.32%). Al sacar los tejidos del anticuerpo primario, se realizaron lavados junto con el bloqueo para el anticuerpo secundario durante 1 hr con albúmina 0.1% (1%) y Tx (0.02%). La incubación del anticuerpo secundario se realizó por dos horas (ver tabla de anticuerpos para cada experimento) en una solución de Tritón 10X (0.32%) y albúmina 0.1% (1%). El anticuerpo secundario se lavó con TBS y Tritón 10X (0.02%) (4 lavados de 10 minutos). Para el revelado, los tejidos se incubaron en solución avidina-biotina (Kit ABC; VECTASTAIN, PK-6100) en 0.32% de Tritón 10X (Vector Laboratories, Burlingame, CA) durante 90 minutos, y la reacción de ABC se reveló con DAB (3,3-Diaminobenzidina hidrato tetrahidroclorídrico; Sigma Aldrich, MKAA1015) (Park y cols. 1996). Al finalizar el revelado, los tejidos se montaron en laminillas gelatinizadas utilizando como resina Permount (Fisher Scientific, 98088-24) para cubrirlas para su posterior análisis.

7.2 Protocolo General para Inmunohistoquímica con fluorescencia

El protocolo para inmunohistoquímica con fluorescencia es muy similar al utilizado cuando se revela con DAB, sin embargo a continuación se describe la técnica completa: los lavados e incubaciones realizadas se los tejidos se mantuvieron en constante agitación y en un cuarto oscuro a partir del anticuerpo secundario. Los tejidos se lavaron en una solución amortiguadora de fosfatos (TBS) (3 lavados de 10 min c/u), para después permeabilizar las membranas celulares con lavados de borohidrato de sodio (0.5%) (1 lavado de 15 min), Tritón 10X (1%) y H₂O₂ (1%) (1 lavado de 30 min) y DMSO (1%) (1 lavado de 10 min). Los tejidos se incubados en 2N HCL a 37C durante 30 minutos para abrir los núcleos celulares y permitir la incorporación posterior del anticuerpo. El bloqueo de sitios inespecíficos se realizó incubando los tejidos durante 30 min con albúmina 0.1% (10%) y Tritón 10X (0.3%). Los tejidos se incubaron

con el ò los anticuerpos primarios (en el caso de dobles inmunomarcajes) (ver tabla de anticuerpos para cada experimento) durante 48 horas a 4° C en una solución de albúmina 0.1% (1%) y Tritón 10X (0.32%). Al sacar los tejidos del anticuerpo primario, se realizaron lavados junto con el bloqueo para el anticuerpo secundario durante 1 hr con albúmina 0.1% (1%) y Tx (0.02%). La incubación de los anticuerpos secundarios se realizó por dos horas (ver tabla de anticuerpos para cada experimento) en una solución de Tritón 10X (0.32%) y albúmina 0.1% (1%). El anticuerpo secundario se lavó con TBS y Tritón 10X (0.02%) (4 lavados de 10 minutos). Los tejidos se lavaron finalmente con TBS (4 lavados de 10 minutos) y se montaron en laminillas gelatinizadas utilizando como resina Acqua Poly/Mount (Polysciences, Inc., 633008) para cubrirlas. Las laminillas se mantuvieron protegidas de la luz y a 4C para su posterior análisis.

8. Análisis Cuantitativo de las células nuevas

Al finalizar las inmunohistoquímicas, los cortes se montaron sobre laminillas, se cubrieron y se analizaron bajo el microscopio.

8.1 Cuantificación de células nuevas (IR-BrdU)

La cuantificación y análisis de las células nuevas se realizó en el microscopio óptico OLYMPUS BX60F-3. Con ayuda del software Image Pro Plus 6.1 se tomaron una serie de imágenes con el objetivo de 20X para realizar las reconstrucciones de cada una de las zonas de interés (ejemplo: ZSV, VMR, BOP y BOA). Una vez que se obtuvieron las reconstrucciones, se delimitaron áreas de interés (AOI's), las cuales servirán para la posterior cuantificación automática de las células. El conteo celular se realizó sobre cada sección utilizando los AOI's. La cuantificación se realizó de manera automática con el software (Image Pro Plus 6.1), contando cada una de las células reveladas con la inmunohistoquímica, utilizando la intensidad de la marca. El número de células que se obtuvo por corte (5 cortes por sujeto) se sumó y se promedió para tener un número de células promedio por sujeto. Después se promedió el número de células por grupo experimental. Los resultados se reportan como densidad de células IR-BrdU por mm², lo cual se obtuvo con el área de cada uno de los AOI's utilizados.

8.2 Cuantificación de células con doble marcaje (IR-BrdU/DCX; BrdU/NeuN; BrdU/GFAP; BrdU/cFos)

Para la cuantificación y análisis de las células doblemente marcadas por fluorescencia para BrdU/DCX, BrdU/NeuN, BrdU/GFAP y BrdU/cFos, el análisis se realizó con imágenes obtenidas con el microscopio confocal ZEISS LSM 510 invertido y el microscopio confocal ZEISS 789. Se realizó la toma de imágenes de cada región de interés (ejemplo: ZSV, VMR, BOP y BOA) utilizando el objetivo 25X. Para cada región de interés se obtuvo un stock de 12 rebanadas ópticas (2µm por cada rebanada óptica) en plano Z. Estos stocks nos permitieron analizar con profundidad, y en tercera dimensión, cada una de las células IR-BrdU que colocalizaran con alguno de los otros marcadores que se utilizaron (DCX, NeuN, GFAP y cFos). Así mismo, los stocks de imágenes se utilizaron para confirmar cada colocalización de marca (BrdU/DCX, BrdU/NeuN, BrdU/GFAP y BrdU/cFos) mediante la herramienta de análisis ortogonal del software AimImageEximanager. Cada conjunto de imágenes se dividió en 4 cuadrantes para poder realizar el conteo de células colocalizadas con el análisis ortogonal.

El conteo de células colocalizadas se realizó con respecto a las células IR-BrdU. El total de células IR-BrdU por cuadrante correspondió al 100%, y de éstas células IR-BrdU se contaron cuántas células expresaban algún otro marcador para obtener el porcentaje de colocalización por cuadrante, por ejemplo: si de 4 células IR-BrdU (100%) hubo 2 que colocalizaron con NeuN, tendríamos un 50% de células IR-BrdU/NeuN. Con estos datos, se obtuvieron 4 conteos por imagen, de un total de 4 imágenes por sujeto analizadas. Los porcentajes fueron promediados por sujeto primero y luego por grupo. Al final, se obtuvo el promedio de células doblemente marcadas por grupo experimental (4 sujetos por grupo) y se obtuvieron los porcentajes de células con doble marcaje.

9. Análisis Estadístico

Los datos obtenidos en nuestros experimentos no fueron datos normales (fallaron en la prueba de normalidad realizada Shapiro-Wilk), por lo que, para su análisis estadístico, se utilizaron pruebas no-paramétricas. Para el análisis de los datos conductuales se utilizó una prueba U-Mann Whitney para comparar los dos grupos de cópula (cópula regulada vs cópula no regulada). Para los conteos celulares se utilizó la prueba Kruskal Wallis para comparar los cinco diferentes grupos, seguida de una U-Mann Whitney como prueba posthoc. Todos los datos se analizaron con el software SigmaPlot 11.0.

VII. EXPERIMENTO 1

Proliferación celular en la zona subventricular y la vía migratoria rostral

1. Hipótesis Particular

1. La cópula regulada aumentará la proliferación celular en la zona subventricular.
2. La cópula regulada aumentará la proliferación celular en la vía migratoria rostral.

2. Objetivos Particulares

1. Localizar espacialmente y cuantificar el número de células nuevas, así como el porcentaje de las células nuevas que sean neuronas inmaduras en la zona subventricular 2 días después de la cópula regulada:
 - a. Identificar y localizar, mediante marcaje inmunohistoquímico las células IR a BrdU en la ZSV.
 - b. Cuantificar las células IR a BrdU en la ZSV.
 - c. Obtener el porcentaje de células IR a BrdU que expresen DCX (presente en neuronas inmaduras)
 - d. Obtener el porcentaje de células IR a BrdU que expresen GFAP (presente en células progenitores)

2. Localizar espacialmente y cuantificar el número de células nuevas, así como el porcentaje de las células nuevas que sean neuronas inmaduras en la vía migratoria rostral 2 días después de la cópula regulada:
 - a. Identificar y localizar, mediante marcaje inmunohistoquímico las células IR a BrdU en la VMR.
 - b. Cuantificar las células IR a BrdU en la VMR.
 - c. Obtener el porcentaje de células IR a BrdU que expresen DCX (presente en neuronas inmaduras)
 - d. Obtener el porcentaje de células IR a BrdU que expresen GFAP (presente en células progenitores)

3. Diseño Experimental

Para evaluar la proliferación celular en la ZSV y en la VMR, así como los efectos que las diferentes conductas (estímulos) tienen sobre este fenómeno, los sujetos (ver Tabla 2) fueron sacrificados 2 días después de haberles administrado el marcador y de haber realizado la prueba conductual (ver Fig. 22).

Tabla 2. Sujetos y pruebas conductuales realizadas.

Grupos	Sujetos (n)	No de Pruebas Conductuales
<i>Control</i>	7	1
<i>Exposición a acetato de amilo</i>	7	1
<i>Exposición a un macho</i>	7	1
<i>Cópula Regulada</i>	7	1
<i>Cópula No Regulada</i>	7	1



Figura 22. Diseño experimental para evaluar la proliferación celular de la Zona Subventricular (ZSV) y de la Vía Migratoria Rostral (VMR). En el día 0 las ratas realizaron la prueba conductual (con duración de 1hr) se les administró el marcador BrdU en tres tiempos: una hora antes, al término y una hora después de finalizada la prueba conductual, con una dosis de 300mg/kg total (100mg/kg c/u). El sacrificio de las ratas se realizó en el día 2.

3.1 Histología e Identificación de las células nuevas

Cuantificación de células nuevas (BrdU, BrdU/DCX y BrdU/GFAP)

El análisis de las células BrdU-IR se realizó sobre las reconstrucciones obtenidas previamente (ver sección de Material y Método General para los detalles). Se delimitaron los AOI's para las áreas de interés por cada región donde se cuantificaron las células (ver Fig. 23), siendo para la ZSV: región dorsal, región ventral, región medial-anterior y región anterior, y para la VMR: región posterior, región medial y región anterior (Whitman y Greer, 2009).

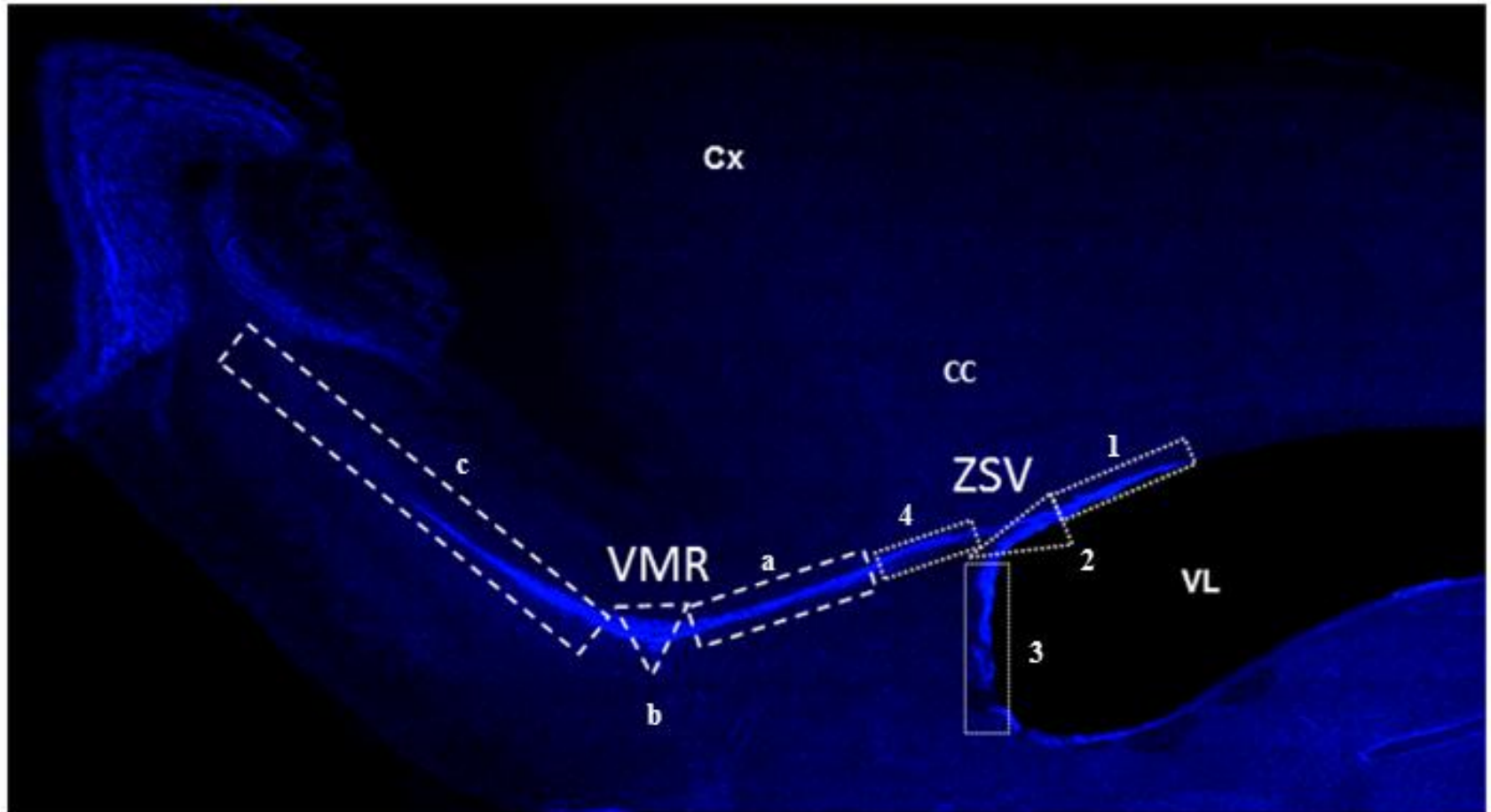


Figura 23. Reconstrucción de las regiones de la ZSV y de la VMR. Reconstrucción representativa de un corte sagital de rata, de 30 mm de grosor donde se observan claramente las diferentes secciones de la ZSV: 1-región dorsal, 2-región medial anterior, 3-región ventral, 4-región anterior; y de la VMR: a-región posterior, b-región medial y c-región anterior. La imagen muestra una reconstrucción utilizando el intercalante de DNA –Hoechst que nos permite ver todos los núcleos celulares en azul.

A continuaci3n se presenta una tabla con los detalles de los anticuerpos utilizados en este experimento (Tabla 3).

Tabla 3. Anticuerpos utilizados para evaluar la proliferaci3n celular de la ZSV y de la VMR.

Anticuerpo primario	Especie	Concentraci3n	Marca y No. de Cat3logo	Anticuerpo secundario	Concentraci3n	Marca y No. de Cat3logo
BrdU	rat3n	1:2000	BD Biosciences, 347580	IgG-rat3n	1:500	VECTOR, BA-2000
BrdU	rat3n	1:2000	BD Biosciences, 347580	Alexa 568	1:1250	Invitrogen, A11031
DCX	cobayo	1:500	Millipore, AB2253	CY2	1:1000	Jackson Immuno., 706-226-148

VIII. EXPERIMENTO 2

Supervivencia de las células nuevas en el bulbo olfatorio accesorio

1. Hipótesis Particular

La cópula regulada aumentará la supervivencia de las nuevas células en el bulbo olfatorio principal y accesorio.

2. Objetivos Específicos

1. Cuantificar el número de células nuevas, así como el porcentaje de las células nuevas que sean neuronas en el bulbo olfatorio principal 45 días después de la cópula regulada:
 - a. Identificar y localizar, mediante marcaje inmunohistoquímico las células IR a BrdU en el BOP.
 - b. Cuantificar las células IR a BrdU en el BOP.
 - c. Obtener el porcentaje de células IR a BrdU que expresen NeuN (proteína presente en neuronas maduras), o GFAP (proteína presente en glía, principalmente astrocitos).

2. Cuantificar el número de células nuevas, así como el porcentaje de las células nuevas que sean neuronas en el bulbo olfatorio accesorio 45 días después de la cópula regulada:
 - a. Identificar y localizar, mediante marcaje inmunohistoquímico las células IR a BrdU en el BOA.
 - b. Cuantificar las células IR a BrdU en el BOA.
 - c. Obtener el porcentaje de células IR a BrdU que expresen NeuN (proteína presente en neuronas maduras), o GFAP (proteína presente en glía, principalmente astrocitos).

3. Evaluar el porcentaje de activación de las células nuevas en BOP y en BOA tras un segundo encuentro sexual el día 45:
 - a. Obtener el porcentaje de células IR a BrdU que expresen cFos (gen de activación temprana-indicador de actividad celular) en el BOP y en el BOA.

3. Diseño experimental

Para evaluar la supervivencia celular en el BOP y el BOA, así como los efectos que los diferentes estímulos tienen sobre este fenómeno, los sujetos (ver Tabla 4) fueron sometidos a dos pruebas conductuales en total y sacrificados 45 días después de haberles administrado el marcador. Como se observa en la Fig. 24, la primera prueba se realizó en el día 0 y la segunda 45 días después. Los sujetos fueron sacrificados 30 min después de la segunda prueba.

Tabla 4. Sujetos y pruebas conductuales realizadas.

Grupos	Sujetos (n)	No de Pruebas Conductuales
<i>Control</i>	7	2
<i>Exposición a acetato de amilo</i>	7	2
<i>Exposición a un macho</i>	7	2
<i>Cópula Regulada</i>	7	2
<i>Cópula No Regulada</i>	7	2

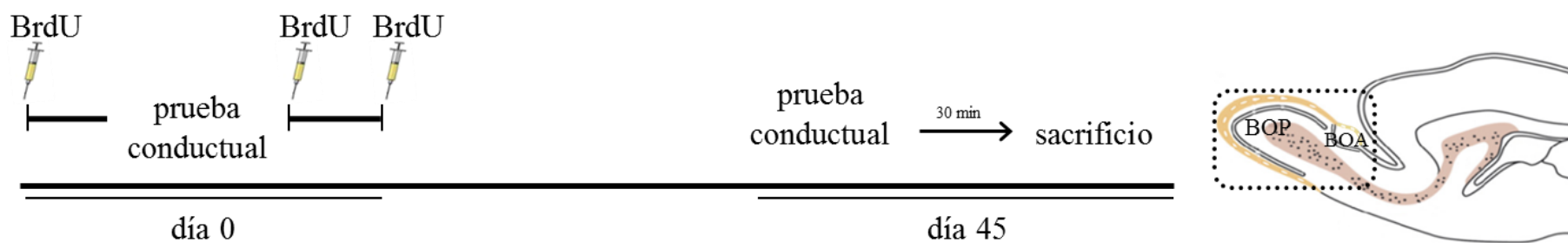


Figura 24. Diseño experimental para evaluar la supervivencia celular del Bulbo Olfatorio Principal (BOP) y del Bulbo Olfatorio Accesorio (BOA). En el día 0 las ratas realizaron la prueba conductual (con duración de 1hr) se les administró el marcador BrdU en tres tiempos: una hora antes, al término y una hora después de finalizada la prueba conductual, con una dosis de 300mg/kg total (100mg/kg c/u). En el día 45, las ratas realizaron la misma prueba conductual que realizaron en el día 0. El sacrificio de las ratas se realizó en el día 45, 30 minutos después de finalizar su segunda prueba conductual.

Para poder evaluar el objetivo uno de este experimento, los animales realizaron la prueba conductual correspondiente y recibieron el BrdU el mismo día de la prueba conductual. El tiempo de 45 días que se esperó para sacrificar a los animales y poder observar las células nuevas (BrdU+) en el BOA, se tomó del trabajo de Petreanu y Alvarez-Buylla (2002) en donde describen que entre los días 15 y 30 días de vida, las células nuevas pasan por un periodo de muerte celular en donde mueren aproximadamente el 50% de ellas, y es hasta el día 45 cuando las células nuevas que han llegado al BO ya han sobrevivido y se mantendrán por un periodo de varios meses hasta ser reemplazadas nuevamente (Fig. 25).

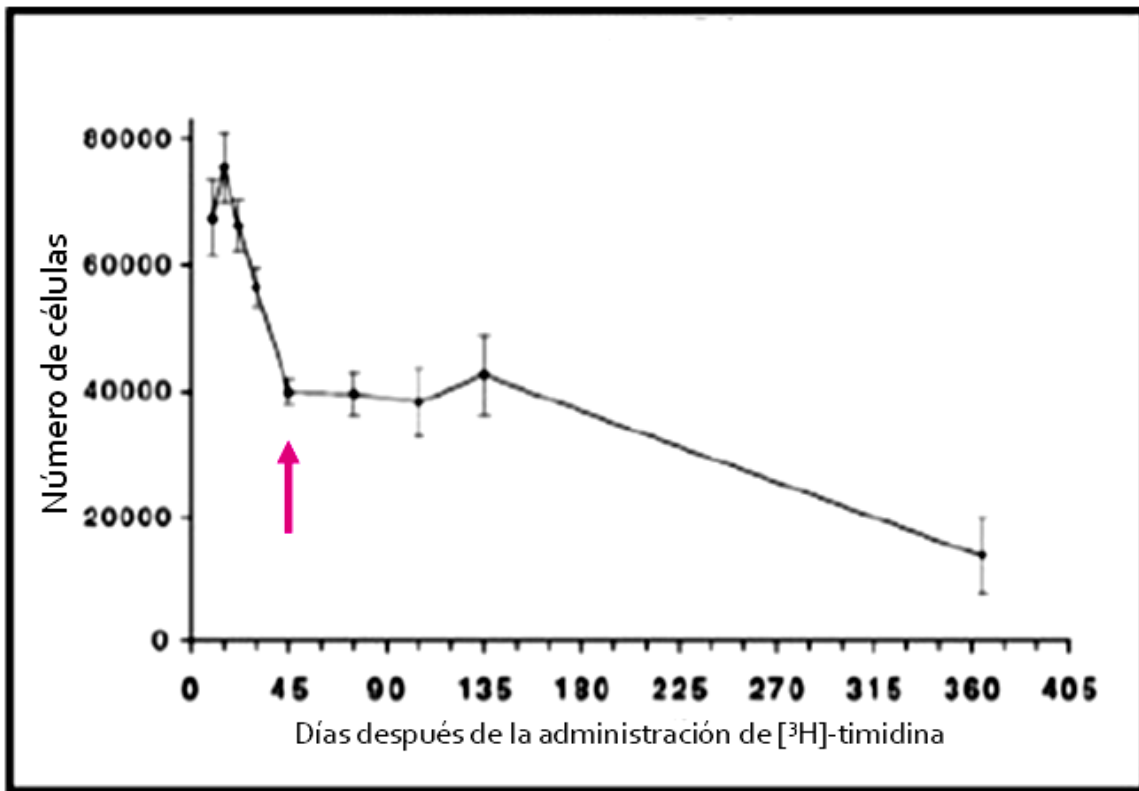


Figura 25. Supervivencia de las células nuevas en el bulbo olfatorio marcadas con [3H]-timidina. Se observa el pico máximo en el número de estas células en el día 15, del día 15 al 30 se observa un periodo de muerte celular, seguido de un número constante de células comenzando en el día 45 (indicado por la flecha) y hasta el día 135 aproximadamente y después comienza un segundo periodo de muerte celular. *Modificada de Petreanu y Alvarez-Buylla (2002).*

Para poder evaluar el objetivo dos, las ratas realizaron una segunda prueba conductual antes de ser sacrificadas para determinar si estas células nuevas que han sobrevivido, e idealmente se han integrado a las redes preexistentes del BO, son completamente maduras y responden a estímulos. Se sabe que las neuronas de 45 días de vida ya son capaces de presentar potenciales de acción, y por lo tanto de responder eléctricamente a un estímulo, y se presupone, que esto se da porque ya forman parte de redes neuronales (Petreanu and Alvarez-Buylla 2002; Whitman and Greer 2009). En este experimento no se pretenden analizar las propiedades eléctricas como indicador de madurez y capacidad de respuesta de las nuevas neuronas, sin embargo, existe una manera de evaluar la activación celular mediante la localización de los genes inmediatos de expresión temprana como la proteína Fos producto de la activación del gen c-fos. Se ha descrito una correlación entre la expresión de Fos en el núcleo celular y el incremento intracelular de calcio, así como la activación de cascadas de segundos mensajeros (Guevara-Guzman, Barrera-Mera et al. 1997), por lo que resulta ser un buen indicador de la actividad celular que únicamente está presente en células maduras.

Por esta razón, se utilizaron los mismos animales que para el primer objetivo, en los que se les administró el marcador BrdU el día 0, que fue el mismo día de la primera prueba conductual, para posteriormente ser alojados por 45 días en sus cajas con alimento y bebida *ad libitum*. En el día 45, estos animales realizaron una segunda prueba conductual, idéntica a la realizada en el día 0 y fueron sacrificados 30 minutos después para determinar si estas células expresan la proteína Fos como indicador de activación neuronal. Esta segunda prueba conductual no tendrá efecto sobre el proceso de generación de las células, ya que para éste momento (día 45) las células BrdU-ir ya están completamente maduras e incorporadas en las capas correspondientes del bulbo olfatorio, por lo que el único efecto que puede tener el estímulo es activarlas.

Las ratas se sacrificaron 45 días después de la prueba conductual. Fueron perfundidas y los tejidos procesadas como se describió previamente para el experimento 1. Para la localizar y cuantificar a las células nuevas (IR-BrdU) se realizó en primer lugar una inmunohistoquímica para BrdU revelada con DAB, y después inmunohistoquímicas dobles para identificar y cuantificar a las células nuevas (IR-BrdU) que fueran neuronas maduras (NeuN, MAP-2b),

células gliales (GFAP) y células activas (c-Fos). El protocolo para estas inmunohistoquímicas está descrito con detalle en la sección VI, y a continuación se presenta una tabla con los detalles de los anticuerpos utilizados en este experimento (Tabla 5).

Tabla 5. Anticuerpos utilizados para evaluar la supervivencia y activación celular en el BOP y BOA.

Anticuerpo primario	Especie	Concentración	Marca y No. de Catálogo	Anticuerpo secundario	Concentración	Marca y No. de Catálogo
BrdU	ratón	1:2000	BD Biosciences, 347580	IgG-ratón	1:500	VECTOR, BA-2000
BrdU	rata	1:800	AbD Serotec, OBT0030	Alexa 488	1:1250	Invitrogen, A21208
NeuN	ratón	1:250	Millipore, MAB377B	Alexa 568	1:1250	Invitrogen, A11031
NeuN	ratón	1:250	Millipore, MAB377B	CY3	1:1000	Jackson Immuno., 315-165-003
MAP-2b	conejo	1:1500	Millipore, AB5622	Alexa 488	1:1250	Invitrogen, A11034
c-Fos	conejo	1:250	Santa Cruz Biotech., L1609	Alexa 488	1:1250	Invitrogen, A11034
GFAP	conejo	1:500	DAKO, ZO334	Alexa 488	1:1250	Invitrogen, A11034

3.1 Histología e Identificación de las células nuevas

Cuantificación de células nuevas (BrdU, BrdU/NeuN, BrdU/GFAP y BrdU/cFos)

El análisis de las células BrdU-IR se realizó sobre las reconstrucciones obtenidas previamente (ver sección de Material y Método General para los detalles). Se delimitaron los AOI's para las áreas de interés por cada región donde se cuantificaron las células (ver Fig.26), siendo para el BOP: capa glomerular, capa granular y para el BOA: capa glomerular, capa granular y región anterior y región posterior.

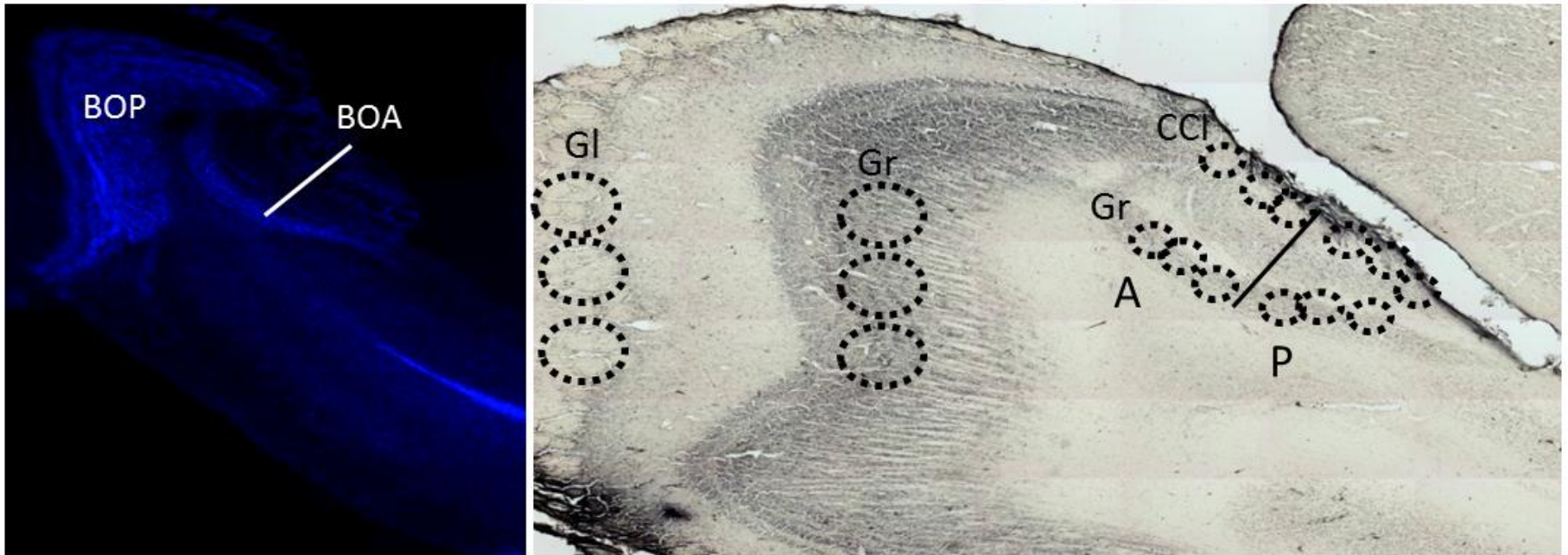


Figura 26. Reconstrucciones sagitales de las regiones del BOP y BOA. Reconstrucciones de cortes sagitales de 30µm de grosor donde se observan claramente las diferentes secciones del BOP: capa glomerular (Gl), capa granular (Gr) y del BOA: capa glomerular (Gl) y capa celular interna (CCI) de las regiones anterior (A) y posterior (P). En la imagen de la izquierda se observa una reconstrucción utilizando el intercalante de DNA –Hoechst que nos permite ver todos los núcleos celulares en azul, donde se señalan el BOP-bulbo olfatorio principal y el BOA-bulbo olfatorio accesorio. En la imagen de la derecha vemos una reconstrucción del BOP y BOA donde se señalan las diferentes capas cuantificadas y las regiones del BOA.

IX. RESULTADOS

1. Experimento 1

Proliferación celular en la zona subventricular y la vía migratoria rostral

1.1 Conducta sexual

En este experimento, las hembras realizaron una única prueba conductual en el día que se les administró el marcador BrdU (día 0) (ver Tabla 6). Las hembras que estuvieron sometidas a las pruebas de cópula regulada mostraron un intervalo inter-intromisión (III) mucho mayor que las hembras que no regularon la cópula ($U=10$, $p=0.014$).

La intensidad media de lordosis (IML) y el coeficiente de lordosis (CL) que las hembras presentaron durante la prueba fue igual para las que regularon la cópula, como las que no lo hicieron (IML: $U=34$, $p=0.883$; CL: $U=32$, $p=0.409$). Se observaron también dos parámetros únicos del despliegue de la cópula regulada (porcentaje de salidas y la latencia de regreso después de la monta, la intromisión y la eyaculación) que nos indican que las hembras se alejaron del macho, y regresaron a él después de recibir estimulación sexual (ver Tabla 6 para los valores de $\text{media} \pm \text{error estándar}$).

Por otro lado, las hembras de ambos grupos que realizaron conducta sexual, recibieron estimulación constante durante una hora, sin presentar ninguna diferencia significativa en el número de montas ($U=22$, $p=0.536$), número de intromisiones ($U=16.5$, $p=0.067$) y el número de eyaculaciones ($U=22$, $p=0.313$). Así mismo, la latencia de montas ($U=10$, $p=0.081$), la latencia de intromisión ($U=23$, $p=0.229$) y la latencia de eyaculación ($U=35$, $p=0.962$) fue similar para ambos grupos.

Tabla 6. Parámetros de conducta en la cópula regulada y no regulada en el experimento 1.
 Los datos se expresan como media \pm error estándar (n=9 Cópula Regulada y n=8 Cópula no Regulada).

Parámetros Conductuales	Grupos	
	Cópula Regulada	Cópula no Regulada
IML	1.86 \pm 0.04	1.86 \pm 0.05
CL (%)	99.6 \pm 0.44	100
Porcentaje de Salidas		
Montas	20.44 \pm 6.9	
Intromisiones	61.9 \pm 4.2	
Eyaculaciones	100	
Latencia de Regreso		
Montas	46.6 \pm 27.8	
Intromisiones	51.7 \pm 14.4	
Eyaculaciones	366.7 \pm 79.7	
III (seg)	105.1 \pm 10.6*	64.4 \pm 7.7
Número		
Montas	11.1 \pm 3	15.7 \pm 4.3
Intromisiones	30.1 \pm 3.7	40 \pm 2.8
Eyaculaciones	2.4 \pm 0.24	3 \pm 0.4
Latencias (seg)		
Montas	69.4 \pm 25.9	276.8 \pm 120.1
Intromisiones	371.2 \pm 211.9	479.9 \pm 168.3
Eyaculaciones	1418.9 \pm 330.3	1297.5 \pm 164.6

* Diferente de Cópula no Regulada, p<0.05

1.2 Proliferación celular en la ZSV y la VMR

Cuantificación de la densidad de células BrdU-ir en la ZSV y en la VMR

Zona Subventricular. La densidad de células BrdU-ir fue diferente entre los grupos conductuales (K-W: $H(4)=15.290$, $p=0.004$), observándose un incremento significativo en las hembras expuestas a acetato de amilo ($U=17$, $p=0.032$) y las hembras expuestas a machos sexualmente expertos ($U=16$, $p=0.009$) con respecto a las hembras control.

Vía Migratoria Rostral. La densidad de células BrdU-ir mostró diferencias significativas entre los grupos (K-W: $H(4)=11.140$, $p=0.025$), siendo el grupo de cópula regulada el que mostró un mayor número de células nuevas ($U=1$, $p=0.017$) (Figura 27).

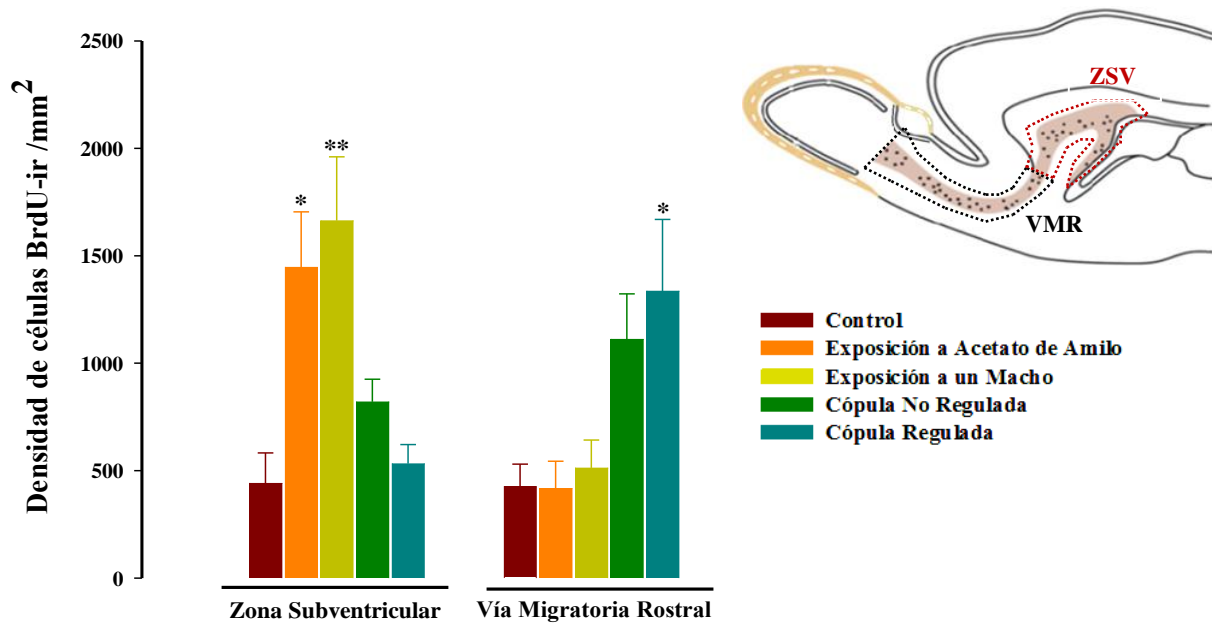


Figura 27. Densidad de células BrdU-ir/mm² en la Zona Subventricular y en la Vía Migratoria Rostral. En la esquina superior derecha se observa un esquema de referencia de las regiones: Zona Subventricular (ZSV) bordeada con líneas punteadas en rojo, y Vía Migratoria Rostral (VMR) bordeada con líneas punteadas en negro. Debajo de la gráfica se observa una tabla con los valores de U-Mann Whitney. C-Control; EA-Exposición a Acetato de Amilo; EM-Exposición al Macho; CNR-Cópula No Regulada CR-Cópula Regulada. ZSV: *diferentes con respecto al Control, $p<0.05$; ** $p<0.01$ y VMR: *diferente de Control, $p<0.05$.

Densidad de células BrdU-ir en las regiones de la ZSV

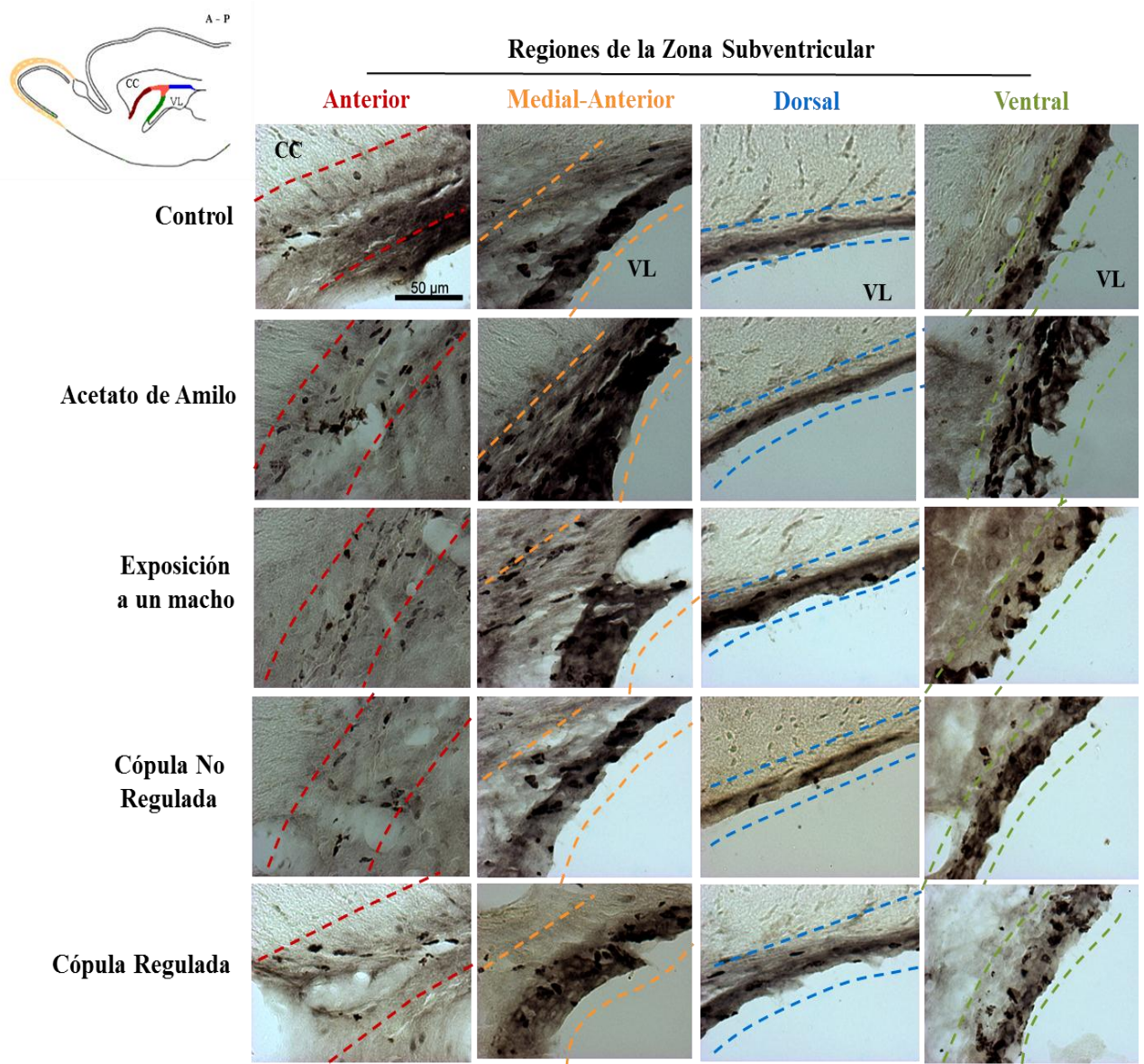
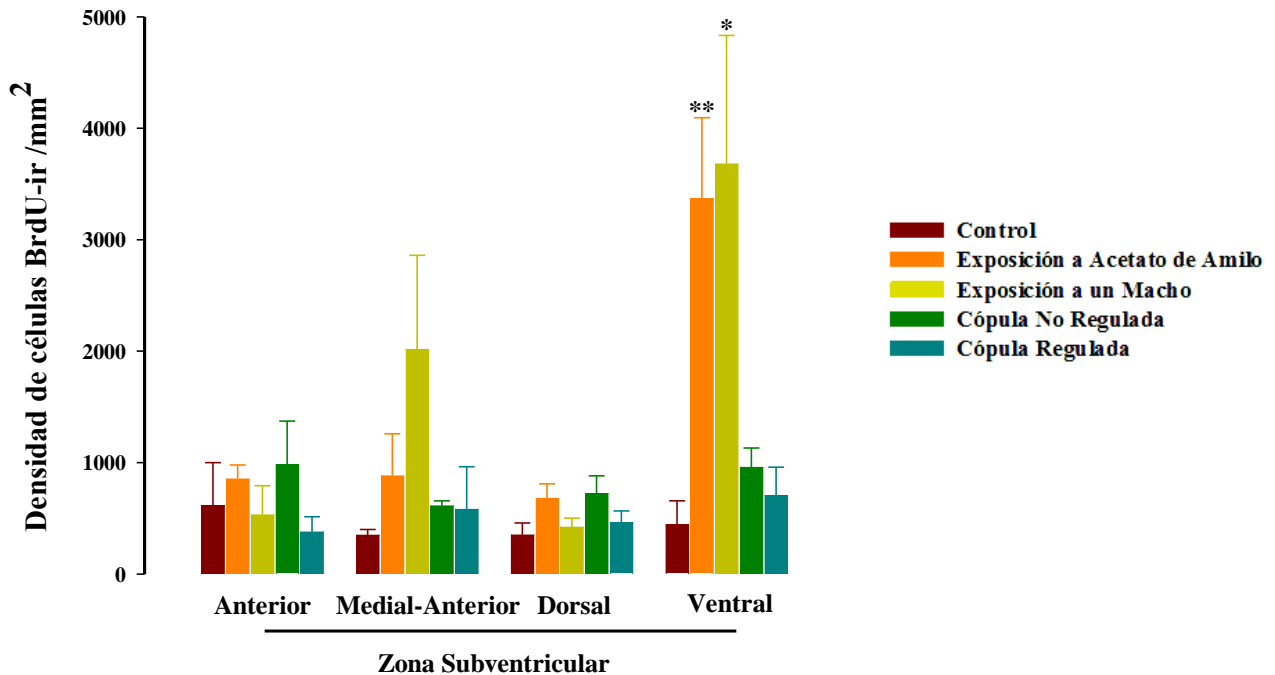


Figura 28. Fotomicrografías representativas de las células BrdU-ir localizadas en las regiones de la Zona Subventricular de los diferentes grupos. En la esquina superior izquierda se observa un esquema donde se localizan las regiones Anterior en rojo, Medial-Anterior en rosa, Dorsal en azul y Ventral en verde, así como algunas referencias anatómicas: Ventrículos Laterales (VL) y Cuerpo Calloso (CC). A-P se refiere a la localización antero-posterior del cerebro.

La expresión de células BrdU-ir se analizó en las diferentes regiones de la ZSV (ver Figuras 27 y 28), encontrando lo siguiente:

Región Anterior: Las células BrdU-ir localizadas en esta región fue igual para todos los grupos (K-W: $H(4)=7.05$, $p=0.133$). *Región Medial-Anterior:* Las células BrdU-ir localizadas en esta región fue igual para todos los grupos (K-W: $H(4)=8.26$, $p=0.082$). *Región Dorsal:* Las células BrdU-ir localizadas en esta región fue igual para todos los grupos (K-W: $H(4)=6.70$, $p=0.153$). *Región Ventral:* Las células BrdU-ir localizadas en esta región mostraron algunas diferencias entre los grupos (K-W: $H(4)=13.109$, $p=0.011$). Las hembras que fueron expuestas a acetato de amilo ($U=0$, $p=0.008$) y a un macho sexualmente experto ($U=2$, $p=0.017$) mostraron un incremento en la densidad de células BrdU-ir con respecto al grupo de hembras control.



Valores de U-Mann Whitney de la comparación de los diferentes grupos vs el grupo C

Región	C vs EA	C vs EM	C vs CNR	C vs CR
ZSV-V	$U=0$, $p=0.008^{**}$	$U=2$, $p=0.017^*$	$U=5$, $p=0.151$	$U=8$, $p=0.421$

Figura 29. Densidad de células BrdU-ir/mm² en las regiones Anterior, Medial-Anterior, Dorsal y Ventral de la Zona Subventricular. Debajo de la gráfica se observa una tabla con los valores de U-Mann Whitney. C-Control; EA-Exposición a Acetato de Amilo; EM-Exposición al Macho; CNR-Cópula No Regulada CR-Cópula Regulada. *Exposición a acetato de amilo y Exposición a un macho diferentes con respecto al Control $p<0.05$, $^{**}p<0.01$.

Densidad de células BrdU-ir en las regiones de la VMR

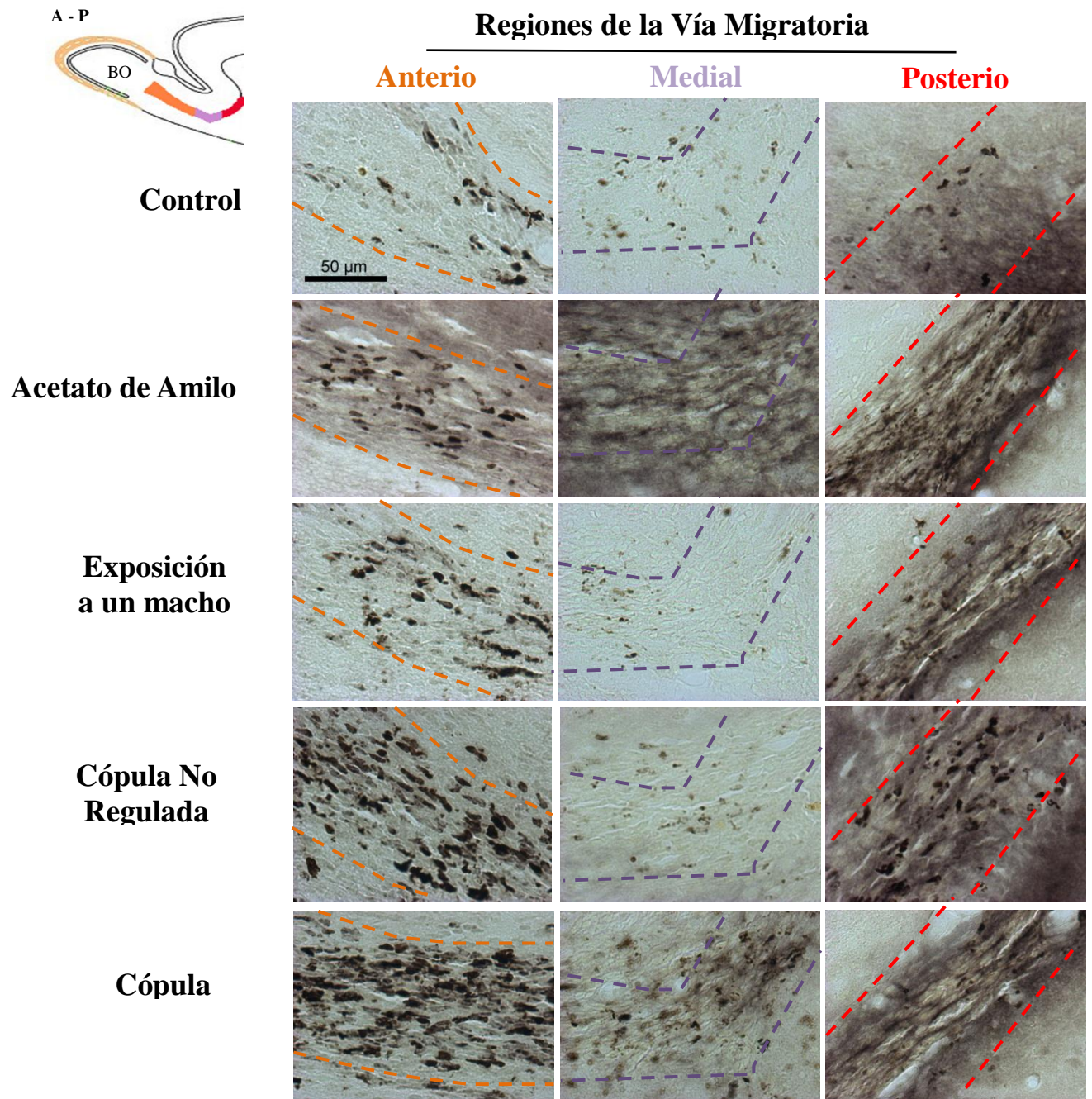
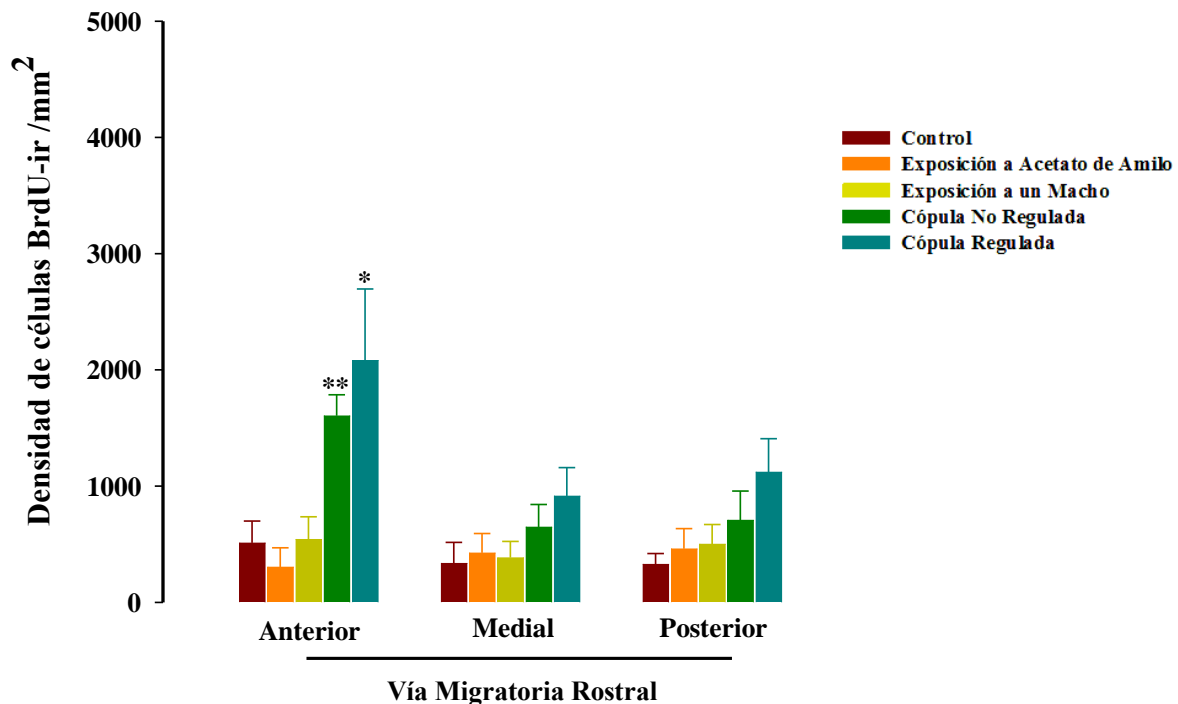


Figura 30. Fotomicrografías representativas de las células BrdU-ir localizadas en las regiones de la Vía Migratoria Rostral de los diferentes grupos. En la esquina superior izquierda se observa un esquema donde se localizan las regiones Anterio en naranja, Medial en morado y Posterior en rojo, así como alguna referencia anatómica: Bulbo Olfatorio (BO). A-P se refiere a la localización antero-posterior del cerebro.

La expresión de células BrdU-ir se analizó en las diferentes regiones de la VMR (ver figuras 30 y 31), encontrando lo siguiente:

Región Anterior: Las células BrdU-ir localizadas en esta región mostraron algunas diferencias entre los grupos (K-W: $H(4)=16.634$, $p=0.002$). Las hembras que no regularon la cópula ($U=2$, $p=0.009$) así como las hembras que regularon la cópula ($U=3$, $p=0.015$) mostraron un incremento en la densidad de células BrdU-ir con respecto al grupo de hembras control.

Región Medial: Las células BrdU-ir localizadas en esta región fue igual para todos los grupos (K-W: $H(4)=5.376$, $p=0.251$). *Región Posterior:* Las células BrdU-ir localizadas en esta región fue igual para todos los grupos (K-W: $H(4)=5.118$, $p=0.275$).



Valores de U-Mann Whitney de la comparación de los diferentes grupos vs el grupo C

Región	C vs EA	C vs EM	C vs CNR	C vs CR
VMR-A	$U=13.5$, $p=0.485$	$U=17.5$, $p=0.937$	$U=2$, $p=0.009^{**}$	$U=3$, $p=0.015^*$

Figura 31. Densidad de células BrdU-ir/mm² en las regiones Anterior, Medial y Posterior de la Vía Migratoria Rostral. Debajo de la gráfica se observa una tabla con los valores de U-Mann Whitney. C-Control; EA-Exposición a Acetato de Amilo; EM-Exposición al Macho; CNR-Cópula No Regulada CR-Cópula Regulada. *Cópula no Regulada y Cópula Regulada diferentes con respecto al Control, $*p<0.05$, $**p<0.01$.

1.3 Identificación fenotípica de las nuevas células en la ZSV y en la VMR

Expresión de DCX en las células BrdU-ir

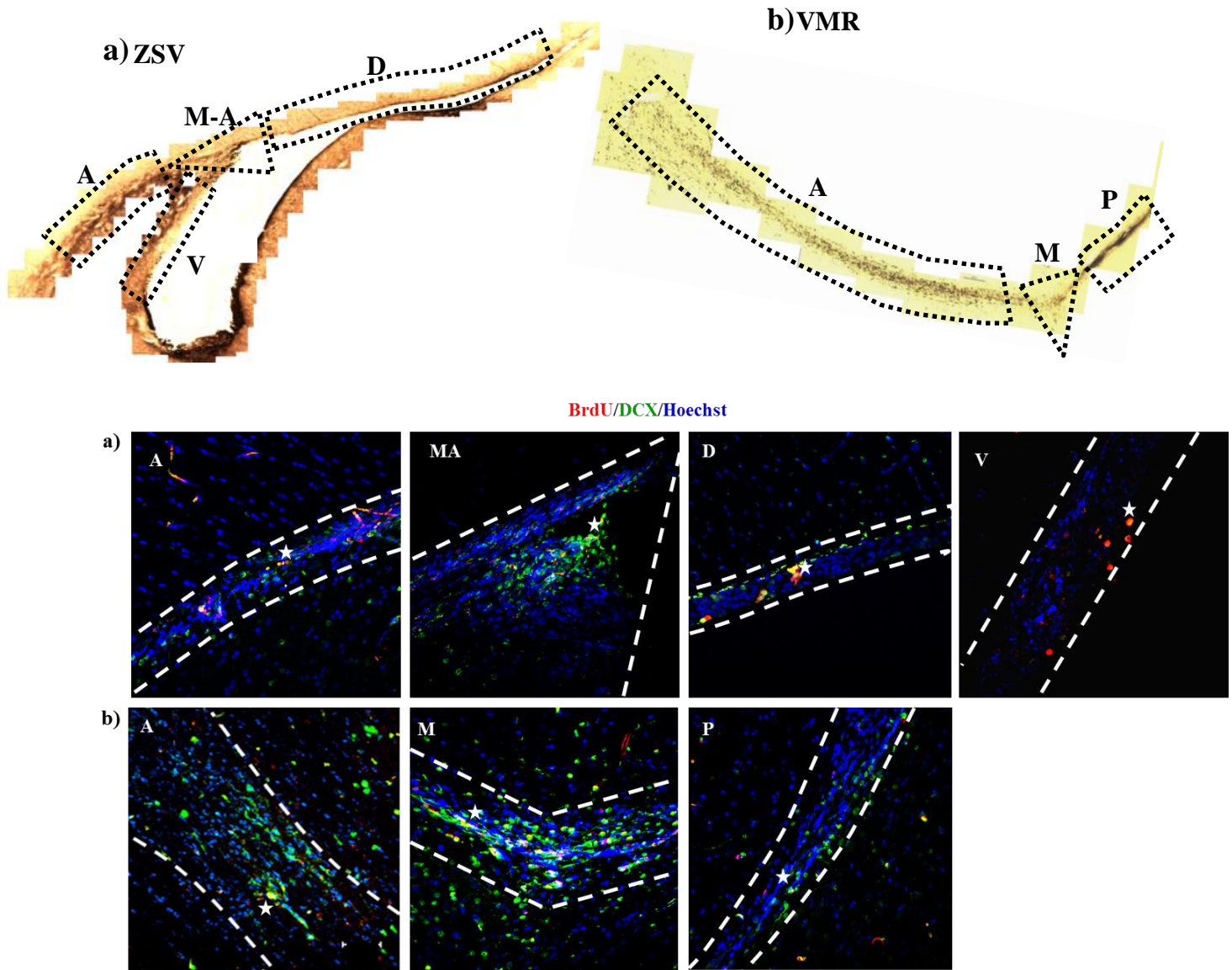


Figura 32. Fotomicrografías representativas de las células BrdU/DCX-ir localizadas en las regiones de la ZSV y en las regiones de la VMR. En la región superior se observan reconstrucciones de la ZSV (a) y de la VMR (b), donde se ven células BrdU-ir reveladas con DAB. En la parte inferior se observan colocalizaciones de marca de BrdU y DCX señaladas con una estrella blanca para cada región de la ZSV (a) y de la VMR (b). La barra corresponde a 50μm.

El porcentaje de células nuevas comprometidas a linaje neuronal -células A- (BrdU-ir que también fueron inmunoreactivas a DCX), se cuantificó y se analizó (ver Figura 32 y Tabla 7) obteniendo lo siguiente: el porcentaje de células BrdU/DCX-ir colocaziadas en la ZSV y en la VMR (regiones completas) fue igual para todos los grupos conductuales (K-W: $H(4)=7.614$, $p=0.107$; K-W: $H(4)=8.786$, $p=0.067$; respectivamente).

El porcentaje de células BrdU/DCX-ir colocalizadas en las diferentes regiones de la ZSV: Anterior, Medial-Anterior, Dorsal y Ventral se analizó para cada uno de los grupos conductuales para evaluar si existe un patrón de proliferación celular específico. El análisis cuantitativo mostró lo siguiente: en las hembras expuestas a acetato de amilo, y en las hembras expuestas a un macho, el porcentaje de colocalización de células BrdU/DCX-ir fue mayor en la región anterior con respecto a las hembras control (K-W: $H(4)=9.947$, $p=0.041$; U=0, $p=0.029$; y, U=0, $p=0.029$; respectivamente). En las regiones medial-anterior, dorsal y ventral, el porcentaje de colocalización de células BrdU/DCX-ir fue el mismo para todos los grupos, por lo que no se encontraron diferencias (K-W: $H(4)=3.189$, $p=0.527$; H-W; $H(4)=4.696$, $p=0.320$; H-W: $H(4)=8.985$, $p=0.061$; respectivamente).

El porcentaje de células BrdU/DCX-ir colocalizadas en las diferentes regiones de la VMR: Anterior, Medial y Posterior se analizó para cada uno de los grupos conductuales para evaluar si existe un patrón de proliferación celular específico. El análisis cuantitativo mostró lo siguiente: en la región posterior, el porcentaje de colocalización de células BrdU/DCX-ir mostró diferencias (K-W: $H(4)=11.679$, $p=0.020$), sin embargo estas diferencias no fueron con respecto al grupo control, fueron entre las hembras expuestas a acetato de amilo con respecto a las hembras expuestas a un macho y con respecto a las hembras que regularon la cópula (U=0, $p=0.029$; U=0, $p=0.029$; respectivamente). En las regiones anterior y medial no se encontraron diferencias en el porcentaje de colocalización de células BrdU/DCX-ir (K-W: $H(4)=4.607$, $p=0.330$; K-W: $H(4)=7.218$, $p=0.125$; respectivamente).

Tabla 7. Porcentaje de células BrdU-ir/DCX-ir en la Zona Subventricular (ZSV) y en la Vía Migratoria Rostral (VMR). Los porcentajes son con respecto a las células BrdU-ir que colocalizaron con las células DCX-ir. Los datos se expresan como media \pm error estándar.

Porcentaje de células BrdU-ir / DCX-ir

Regiones	Grupos					
	Control	Exposición a Acetato de Amilo	Exposición a un Macho	Cópula No Regulada	Cópula Regulada	
ZSV (completa)	35.9 \pm 3.8	67.7 \pm 3.4	67.5 \pm 4.1	58.3 \pm 14.3	53.5 \pm 8.1	
ZSV	<i>Anterior</i>	35.9 \pm 6.8	78.8 \pm 7.3*	73.7 \pm 5.1*	60.8 \pm 15.4	52.1 \pm 5.2
	<i>Medial-Anterior</i>	50.5 \pm 9.4	65.8 \pm 5.5	70.8 \pm 10.5	52.8 \pm 13.7	80.6 \pm 10
	<i>Dorsal</i>	25 \pm 16	69.2 \pm 7.1	64.3 \pm 14.5	66.7 \pm 15.6	58.3 \pm 14.4
	<i>Ventral</i>	32.4 \pm 6.1	57.2 \pm 13.6	61.3 \pm 5.2	70.5 \pm 5.8	43.1 \pm 6.4
VMR (completa)	44.9 \pm 7.3	62.4 \pm 2.3	50.9 \pm 5.7	60.6 \pm 3.4	47.5 \pm 4.6	
VMR	<i>Anterior</i>	36.6 \pm 15.5	59.7 \pm 7.5	63.8 \pm 21.9	71 \pm 4.2	68 \pm 12.0
	<i>Medial</i>	43.7 \pm 8.0	54.6 \pm 6.7	56.8 \pm 2.4	54.8 \pm 8.1	35.5 \pm 3.5
	<i>Posterior</i>	54.4 \pm 8.5	72.9 \pm 7.1	32.1 \pm 6.6	56.2 \pm 5.4	39.6 \pm 6.3

*Exposición a Acetato de Amilo y Exposición a un macho diferente de Control, $p < 0.05$

Expresión de GFAP en las células BrdU-ir

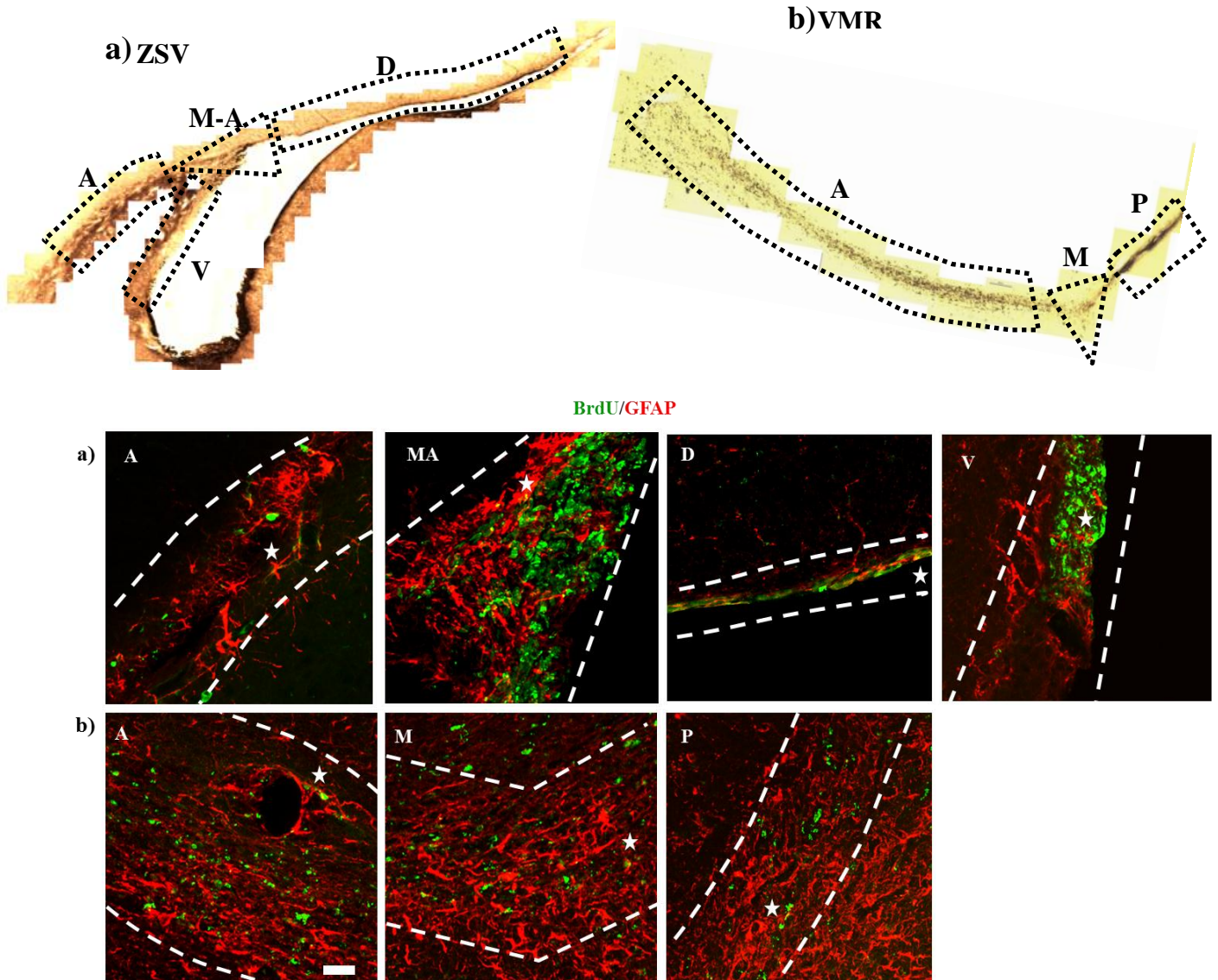


Figura 33. Fotomicrografías representativas de las células BrdU/GFAP-ir localizadas en las regiones de la ZSV y en las regiones de la VMR. En la región superior se observan reconstrucciones de la ZSV (a) y de la VMR (b), donde se ven células BrdU-ir reveladas con DAB. En la parte inferior se observan colocalizaciones de marca de BrdU y DCX señaladas con una estrella blanca para cada región de la ZSV (a) y de la VMR (b). La barra corresponde a 50 μ m.

El porcentaje de células BrdU-ir que también fueron inmunoreactivas a GFAP, se cuantificó y se analizó (ver Figura 33 y Tabla 8) obteniendo lo siguiente: el porcentaje de células BrdU/GFAP-ir colocalizadas en la ZSV y en la VMR (regiones completas) fue igual para todos los grupos conductuales (K-W: $H(4)=6.529$, $p=0.163$; K-W: $H(4)=3.543$, $p=0.471$; respectivamente).

El porcentaje de células BrdU/GFAP-ir colocalizadas en las diferentes regiones de la ZSV: Anterior, Medial-Anterior, Dorsal y Ventral se analizó para cada uno de los grupos conductuales para evaluar si existe un patrón de proliferación celular específico. El análisis cuantitativo mostró lo siguiente: en la región medial-anterior, las hembras que no regularon la cópula mostraron un mayor porcentaje de colocalización de células BrdU/GFAP-ir con respecto a las hembras control (K-W: $H(4)=10.829$, $p=0.029$; U=0, $p=0.029$). En la región ventral, las hembras expuestas a un macho mostraron una mayor colocalización mientras que las hembras que no regularon la cópula mostraron una disminución en el porcentaje con respecto a las hembras control (K-W: $H(4)=12.138$, $p=0.016$; U=0.5, $p=0.029$; U=0, $p=0.029$; respectivamente). En las regiones anterior y dorsal, el porcentaje de colocalización de células BrdU/GFAP-ir fue el mismo para todos los grupos, por lo que no se encontraron diferencias (K-W: $H(4)=8.619$, $p=0.071$; K-W: $H(4)=6.198$, $p=0.185$; respectivamente).

El porcentaje de células BrdU/GFAP-ir colocalizadas en las diferentes regiones de la VMR: Anterior, Medial y Posterior se analizó para cada uno de los grupos conductuales para evaluar si existe un patrón de proliferación celular específico. El análisis cuantitativo mostró que en las regiones anterior, medial y posterior, el porcentaje de colocalización de células BrdU/GFAP-ir fue igual para todos los grupos (K-W: $H(4)=5.597$, $p=0.231$; K-W: $H(4)=2.729$, $p=0.604$; K-W: $H(4)=0.960$, $p=0.916$; respectivamente).

Tabla 8. Porcentaje de células BrdU-ir/GFAP-ir en la Zona Subventricular y en la Vía Migratoria Rostral. Los porcentajes son con respecto a las células BrdU-ir que colocalizaron con las células GFAP-ir. Los datos se expresan como media \pm error estándar.

Regiones	Porcentaje de células BrdU-ir / GFAP-ir				
	Control	Exposición a Acetato de Amilo	Exposición a un Macho	Cópula No Regulada	Cópula Regulada
ZSV (completo)	47.7 \pm 5.6	25.7 \pm 6.2	41.1 \pm 6.3	42.8 \pm 9.5	25.6 \pm 6.9
<i>Anterior</i>	50.4 \pm 8	7.1 \pm 7.1	33.3 \pm 11.8	27.4 \pm 9.4	38.6 \pm 10.8
ZSV <i>Medial-Anterior</i>	43.8 \pm 6.3	43.5 \pm 6.4	50 \pm 18	73.9 \pm 10.2*	23.4 \pm 2.7
<i>Dorsal</i>	60.4 \pm 6.3	27.1 \pm 18	20 \pm 14.1	63.8 \pm 22	25 \pm 14.4
<i>Ventral</i>	32.3 \pm 6.4	25 \pm 14.4	61.3 \pm 5.2 ⁺	6.3 \pm 3.7 ⁺	15.4 \pm 5.4
VMR (completo)	19.2 \pm 4.6	20.5 \pm 3.6	13.6 \pm 8	10.4 \pm 4.1	11.6 \pm 4.2
<i>Anterior</i>	26.7 \pm 9.0	26.2 \pm 8.1	8.3 \pm 8.3	9.1 \pm 5.5	8.2 \pm 5.9
VMR <i>Medial</i>	16.3 \pm 6	9.2 \pm 3.4	9.8 \pm 6.1	5.9 \pm 2.3	6.5 \pm 1.2
<i>Posterior</i>	14.6 \pm 8.6	26.1 \pm 11.5	23 \pm 13.2	16.3 \pm 9.9	20.3 \pm 10.7

*Cópula No Regulada diferente de Control, $p < 0.05$

+Exposición a un Macho y Cópula No Regulada diferente de Control, $p < 0.05$

1.4 Resumen de resultados (Experimento 1)

Conducta sexual

Las hembras realizaron una sola prueba de conducta sexual para este experimento. Las pruebas tuvieron una duración de 1 hora, en la cual, las hembras de ambos grupos: las que regularon la cópula y las que no regularon la cópula comenzaron y permanecieron igualmente receptivas (sin diferencias en IML y CL). El tiempo que pasó entre una estimulación y otra (III) fue mucho mayor en las hembras que regularon la cópula.

La cantidad de estimulación que las hembras, en ambos grupos, recibieron fue igual, ya que no se encontraron diferencias en el número de montas, intromisiones y eyaculaciones por parte del macho. Así mismo, el tiempo que tardaron los machos en iniciar los contactos sexuales con las hembras de ambos grupos fue el mismo (latencias de montas, intromisiones y eyaculaciones).

Proliferación celular en la ZSV y en la VMR

La densidad de células nuevas (BrdU-ir) en la ZSV fue mayor en las hembras que estuvieron expuestas a estímulos olfatorios. Tanto las hembras que estuvieron expuestas al olor de acetato de amilo (olor a plátano) como las expuestas a un macho (sexualmente experto) mostraron un incremento en la densidad de células nuevas en la ZSV. La densidad de células nuevas de las hembras expuestas a estímulos olfatorios no fue diferente entre ellas. Al analizar las regiones que componen a la ZSV se observó que la región ventral es en donde se encuentran las diferencias en la densidad de células nuevas, siendo nuevamente los dos grupos de estimulación olfatoria los que mostraron un incremento en la densidad de células nuevas con respecto a las hembras control.

En la VMR, la densidad de células nuevas (BrdU-ir) fue mayor en las hembras que tuvieron conducta sexual. Al analizar la región completa de la VMR, específicamente las hembras que regularon los contactos (cópula regulada) mostraron un incremento en las células nuevas, sin embargo, las hembras que no regularon los contactos sexuales aunque estadísticamente no mostraron una diferencia con respecto a las hembras control ($p=0.052$), la tendencia es muy clara y sugiere que cualquier contacto sexual pudiera incrementar la densidad

de células nuevas en la VMR. Al analizar las regiones que componen a la VMR se observó que la región anterior es en donde se encuentran las diferencias en la densidad de células nuevas, siendo los dos grupos de conducta sexual, con cópula regulada y no regulada los que mostraron la mayor densidad de células nuevas con respecto a las hembras control.

El porcentaje de células nuevas (BrdU-ir) ya comprometidas a linaje neuronal (inmunoreactivas también a DCX) en toda la ZSV fue igual para todos los grupos. Sin embargo, en la región anterior de la ZSV, las hembras expuestas a estímulos olfatorios (tanto las hembras que estuvieron expuestas al olor de acetato de amilo, como las hembras expuestas a un macho) mostraron un incremento en el porcentaje de células con colocación de BrdU/DCX-ir con respecto al grupo de hembras control. En las regiones medial-anterior, dorsal y ventral no hubo diferencias en el porcentaje de células con colocación de BrdU/DCX-ir.

En toda la VMR, el porcentaje de células con colocación de BrdU/DCX-ir fue igual para todos los grupos. Sin embargo, en la región posterior de la VMR, las hembras expuestas a acetato de amilo mostraron un porcentaje mayor de células con colocación de BrdU/DCX-ir con respecto a las hembras expuestas a un macho y a las hembras que regularon la cópula. Sin embargo esta diferencia en porcentaje no se observó con respecto a las hembras control. En las regiones anterior y medial, no hubo diferencia en el porcentaje de colocación.

El porcentaje de células nuevas (BrdU-ir) que fueron inmunoreactivas también a GFAP en toda la ZSV fue igual para todos los grupos. Sin embargo, en la región medial-anterior de la ZSV, las hembras que realizaron conducta sexual, pero que no regularon los contactos, mostraron un incremento en el porcentaje de células con colocación de BrdU/GFAP-ir con respecto al grupo de hembras control. En la región ventral, las hembras que de igual manera no regularon los contactos, pero que realizaron conducta sexual, mostraron una disminución en el porcentaje de colocación de BrdU/GFAP-ir, mientras que las hembras que estuvieron expuestas a un macho, mostraron el mayor porcentaje de células con colocación de BrdU/GFAP-ir con respecto a las hembras control. En toda la VMR, no se observaron diferencias en el porcentaje de colocación BrdU/DCX-ir.

2. Experimento 2

Supervivencia de las células nuevas en el bulbo olfatorio principal y en el bulbo olfatorio accesorio

2.1 Conducta sexual

En este experimento, las hembras realizaron dos pruebas de cópula regulada y dos de cópula no regulada. La primer prueba se realizó en el día 0, en el que se administró el BrdU, y la segunda prueba el día 45, 30 minutos antes de ser sacrificadas. En la Tabla 9 se observan los datos de las pruebas 1 y 2 de cópula regulada y cópula no regulada.

El intervalo inter-intromisión (III) de las hembras de cópula regulada fue igual al de las hembras que no regularon la cópula (prueba 1 -cópula regulada contra cópula no regulada- $U=24$, $p=0.442$; prueba 2 -cópula regulada contra cópula no regulada- $U=14.5$, $p=0.065$).

La intensidad media de lordosis (IML) y al coeficiente de lordosis (CL) que las hembras presentaron durante las pruebas fue igual para ambos grupos de hembras (prueba 1 -cópula regulada contra cópula no regulada- IML $U=31$, $p=0.959$, CL $U=24$, $p=0.0442$; prueba 2 -cópula regulada contra cópula no regulada- IML $U=26$, $p=0.574$, CL $U=32$, $p=1$).

Se observaron también dos parámetros únicos del despliegue de la cópula regulada que nos indican que las hembras se alejaron del macho, y regresaron a él después de recibir estimulación sexual de igual manera en ambas pruebas (porcentaje de salidas después de la monta $U=32$, $p=1$, después de intromisión $U=15$, $p=0.083$, y después de eyaculación $U=28$, $p=0.721$; y la latencia de regreso después de la monta $U=9.5$, $p=0.548$, después de la intromisión $U=30.5$, $p=0.878$, y después de la eyaculación $U=27$, $p=0.645$).

Por otro lado, las hembras de ambos grupos que realizaron conducta sexual, recibieron estimulación constante durante una hora, presentando una única diferencia en el número de montas entre cópula regulada y cópula no regulada en la prueba del día 45 (prueba 2 -cópula regulada contra cópula no regulada- $U=9.5$, $p=0.029$) sin embargo, en la prueba del día 0 no se

observaron diferencias en el número de montas (prueba 1 -cópula regulada contra cópula no regulada- $U=15.5$, $p=0.152$).

Así mismo, no hubo ninguna diferencia en el número de intromisiones (prueba 1 -cópula regulada contra cópula no regulada- $U=18.5$, $p=0.161$; prueba 2 -cópula regulada contra cópula no regulada- $U=22$, $p=0.328$) y en el número de eyaculaciones (prueba 1 -cópula regulada contra cópula no regulada- $U=26$, $p=0.574$; prueba 2 -cópula regulada contra cópula no regulada- $U=20$, $p=0.397$).

Tampoco se observaron diferencias en la latencia de montas (prueba 1 -cópula regulada contra cópula no regulada- $U=15.5$, $p=0.152$; prueba 2 -cópula regulada contra cópula no regulada- $U=12$, $p=0.142$); la latencia de intromisión (prueba 1 -cópula regulada contra cópula no regulada- $U=14.5$, $p=0.065$; prueba 2 -cópula regulada contra cópula no regulada- $U=16$, $p=0.105$), y la latencia de eyaculación (prueba 1 -cópula regulada contra cópula no regulada- $U=28$, $p=0.721$; prueba 2 -cópula regulada contra cópula no regulada- $U=25$, $p=0.505$).

Tabla 9. Parámetros de conducta en la cópula regulada y no regulada en el experimento 2.
 Los datos se expresan como media \pm error estándar (n=8 Cópula Regulada y n=8 Cópula no Regulada).

Parámetros Conductuales	Grupos			
	Cópula Regulada		Cópula no Regulada	
	prueba 1	prueba 2	prueba 1	prueba 2
IML	1.84 \pm 0.04	1.85 \pm 0.07	1.84 \pm 0.04	1.85 \pm 0.05
CL (%)	99.02 \pm 0.65	100	100	100
Porcentaje de Salidas				
Montas	42.75 \pm 9.9	39.5 \pm 11.2		
Intromisiones	57.38 \pm 7.5	78.25 \pm 7.8		
Eyaculaciones	98.88 \pm 3.12	100		
Latencia de Regreso				
Montas	50.8 \pm 25.4	56.2 \pm 39.4		
Intromisiones	72.6 \pm 21.2	57 \pm 11.6		
Eyaculaciones	164.9 \pm 50.4	200.1 \pm 61.6		
III (seg)	127.7 \pm 24	161.9 \pm 28	94.1 \pm 5.4	92.5 \pm 8.7
Número				
Montas	9.1 \pm 2.5	7.6 \pm 1.9*	21.9 \pm 6.5	27.5 \pm 6.5
Intromisiones	26 \pm 5.1	24.6 \pm 6.3	34 \pm 3.9	32.5 \pm 6.4
Eyaculaciones	3 \pm 0.3	3.3 \pm 0.6	3.4 \pm 0.5	4 \pm 0.4
Latencias (seg)				
Montas	88.5 \pm 40.6	556.2 \pm 372.8	21.8 \pm 6.5	27.5 \pm 6.0
Intromisiones	459.8 \pm 208.2	369.1 \pm 196.1	34 \pm 3.8	32.5 \pm 6.4
Eyaculaciones	1092.9 \pm 210.4	1182.6 \pm 189.5	1382.2 \pm 292.1	901.4 \pm 203.2

*Diferente de cópula no regulada prueba 1, *p<0.05

2.2 Supervivencia celular en el BOP y el BOA

Cuantificación de la densidad de células BrdU-ir en el BOP y BOA

Densidad de células BrdU-ir en el BOP y en el BOA

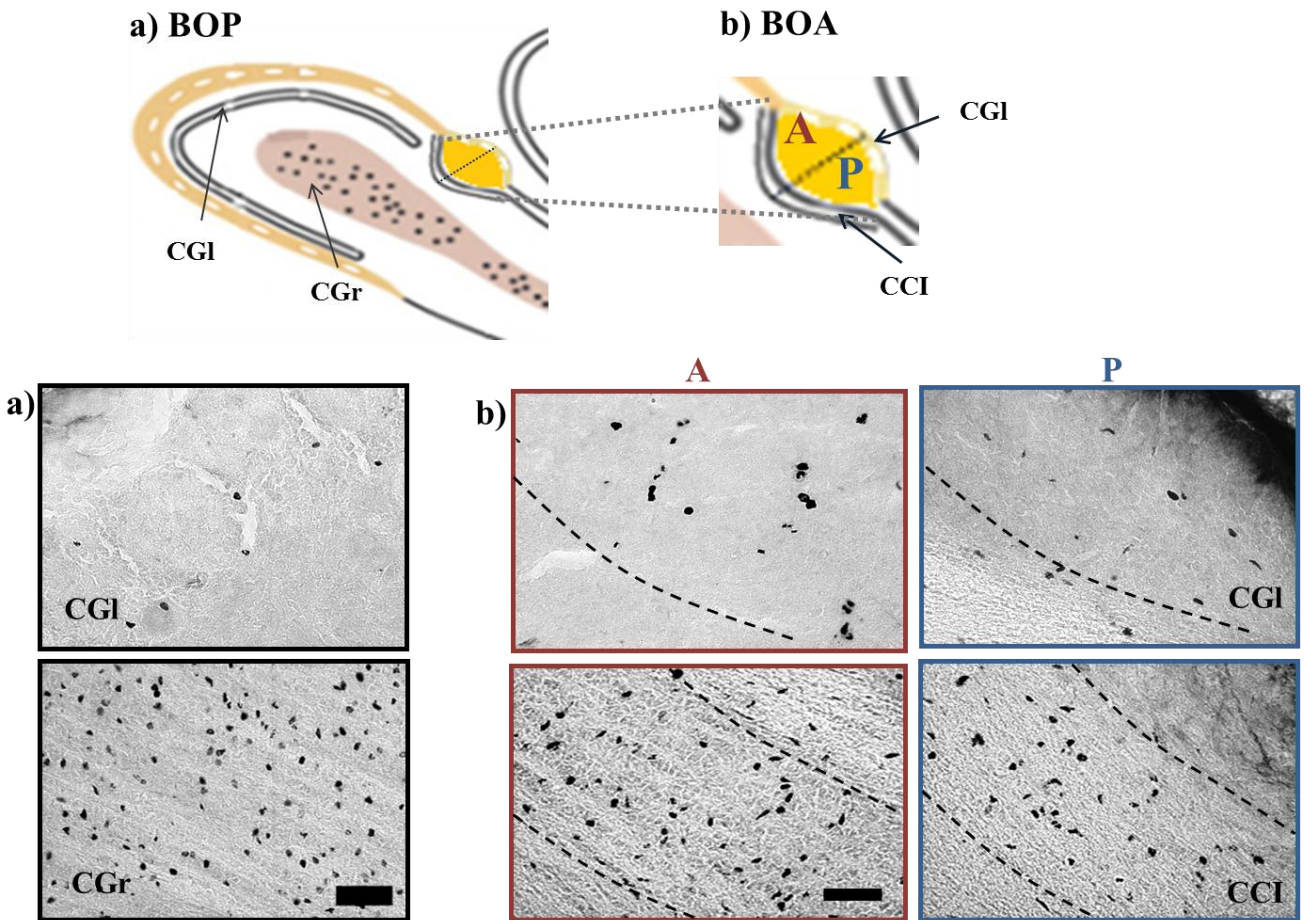
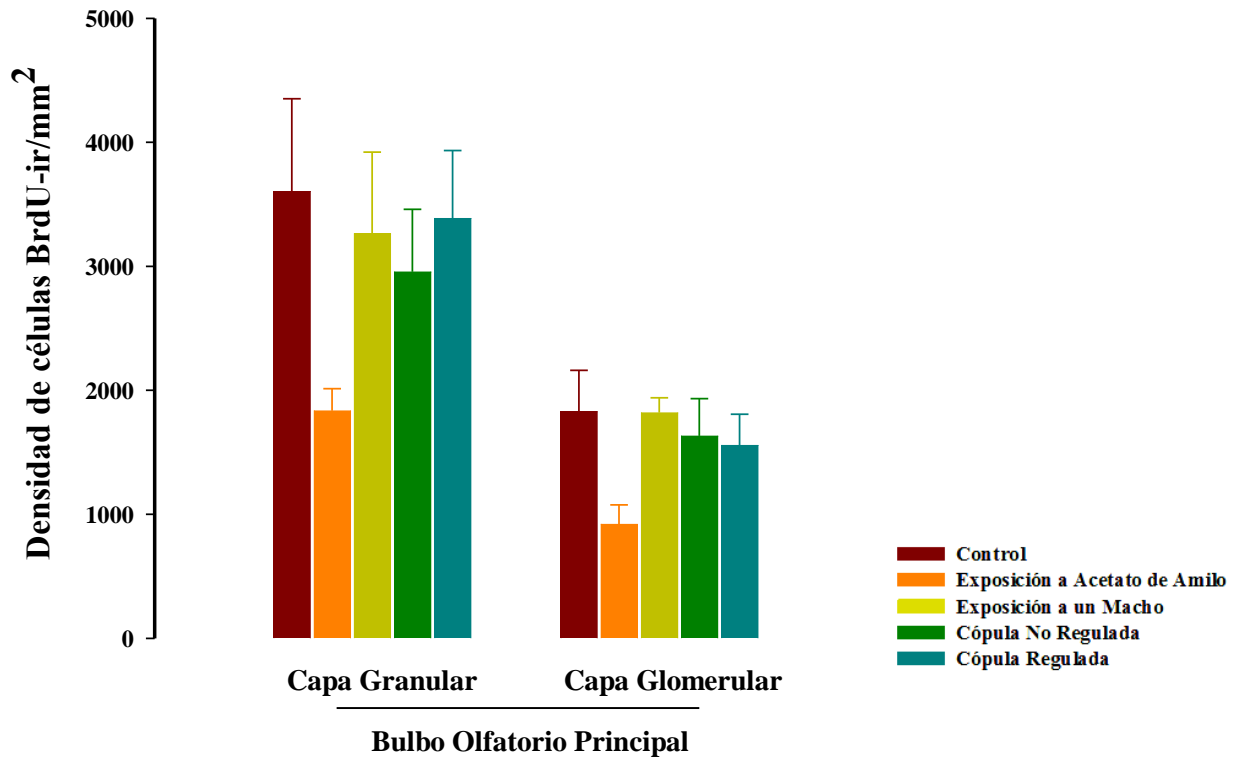


Figura 34. Fotomicrografías representativas de las células BrdU-ir localizadas en el Bulbo Olfatorio.

a) en la esquina superior izquierda se observa un esquema del Bulbo Olfatorio Principal (BOP) y las capas en donde se localizaron las células BrdU-ir: Capa Granular (CGr) y Capa Glomerular (CGI); en la esquina inferior izquierda se observan fotomicrografías de células BrdU-ir en las capas CGI y CGr. b) en la esquina superior derecha se observa un esquema del Bulbo Olfatorio Accesorio (BOA), y las capas en donde se localizaron las células BrdU-ir; Capa Celular Interna (CCI) y Capa Glomerular (CGI), así como las regiones anterior (A-en rojo) y posterior (P-en azul) que lo componen, así como en la esquina inferior derecha se observan fotomicrografías de células BrdU-ir localizadas en las capas CGI A y P, y CCI A y P. La barra mide 50µm.

Bulbo Olfatorio Principal. La densidad de células BrdU-ir/mm² en las capas granular y glomerular fue igual para todos los grupos conductuales (K-W: $H(4)=7.609$, $p=0.107$; K-W: $H(4)=7.885$, $p=0.096$; respectivamente).

Bulbo Olfatorio Accesorio. La densidad de células BrdU-ir/mm² en las capas granular y glomerular fue igual para todos los grupos conductuales (K-W: $H(4)=3.552$, $p=0.470$; K-W: $H(4)=0.162$, $p=0.997$; respectivamente). Ver figuras 34 y 35.



b)

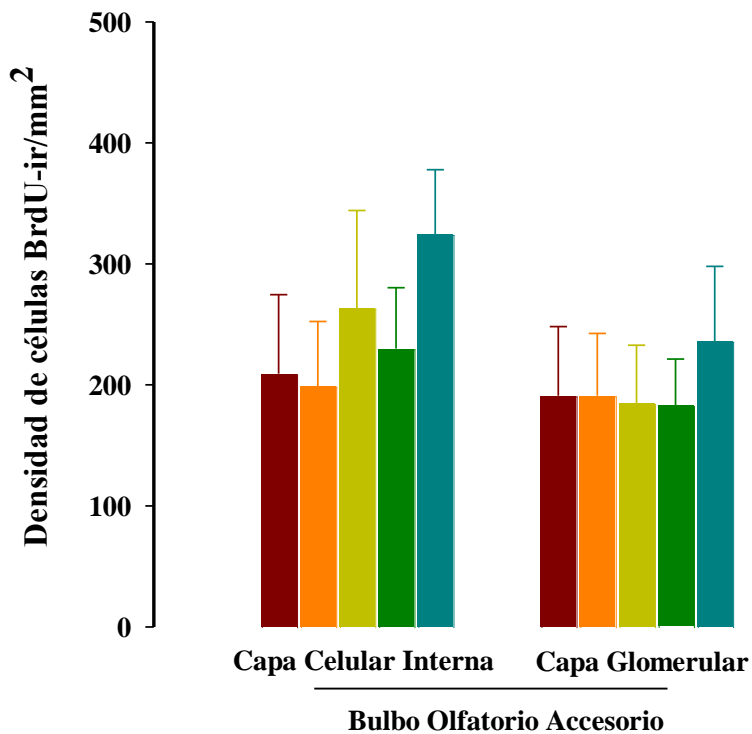


Figura 35. Densidad de células BrdU-ir/mm² en el Bulbo Olfatorio Principal y en el Bulbo Olfatorio Accesorio. El análisis realizado de la densidad de células BrdU-ir en las capas granular y glomerular a), y capa celular interna y glomerular B) de ambas regiones mostró que no hay diferencias significativas entre los diferentes grupos conductuales.

Regiones del BOA: La densidad de células BrdU-ir se analizó en las capas granular y glomerular en la región anterior (rostral) y posterior (caudal) que comprenden al BOA. Capa Granular. *Anterior:* no se encontraron diferencias entre los grupos conductuales (K-W: $H(4)=5.010$, $p=0.286$). *Posterior:* no se encontraron diferencias entre los grupos conductuales (K-W: $H(4)=1.765$, $p=0.779$).

Capa Glomerular. *Anterior:* no se encontraron diferencias entre los grupos (K-W: $H(4)=0.558$, $p=0.968$). *Posterior:* no se encontraron diferencias entre los grupos (K-W: $H(4)=1.696$, $p=0.791$).

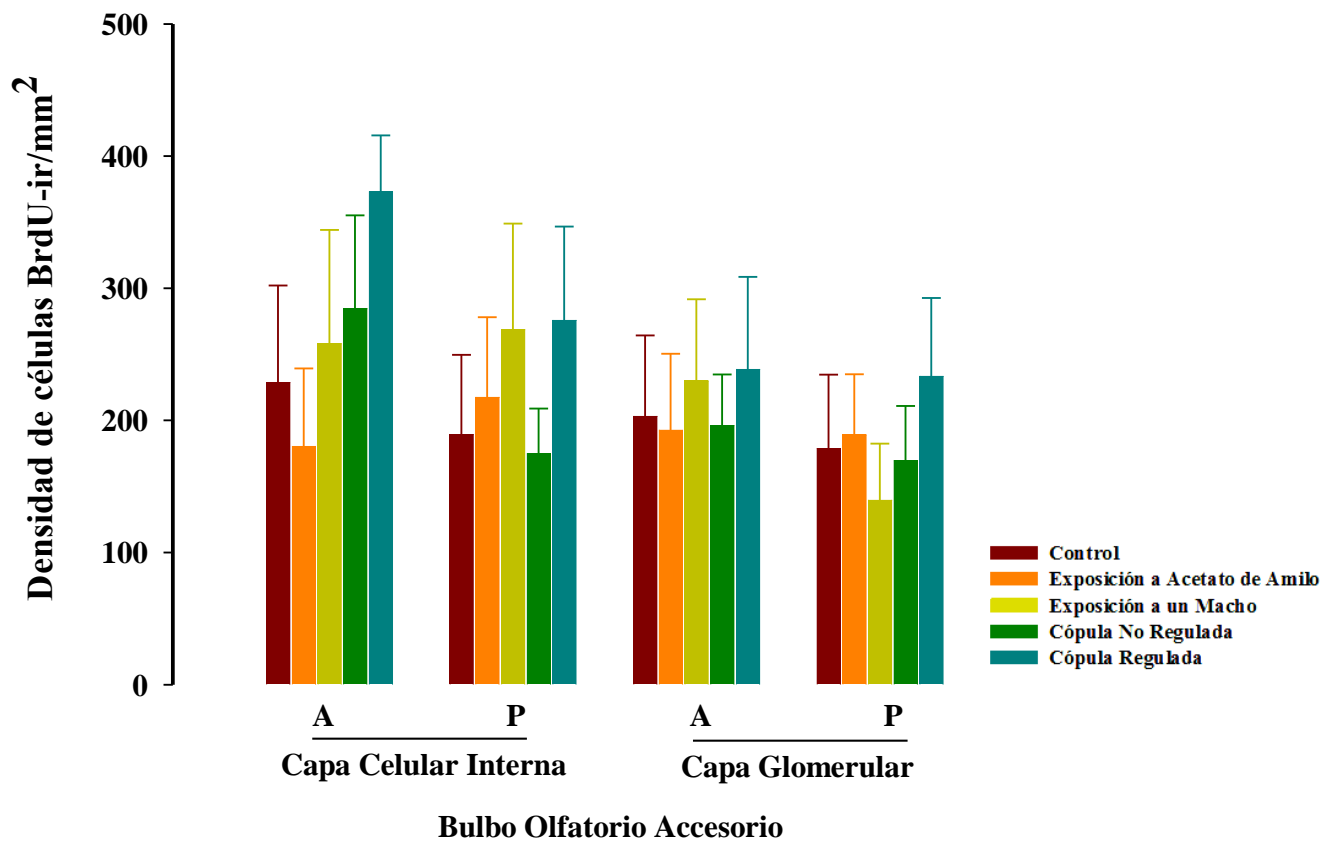
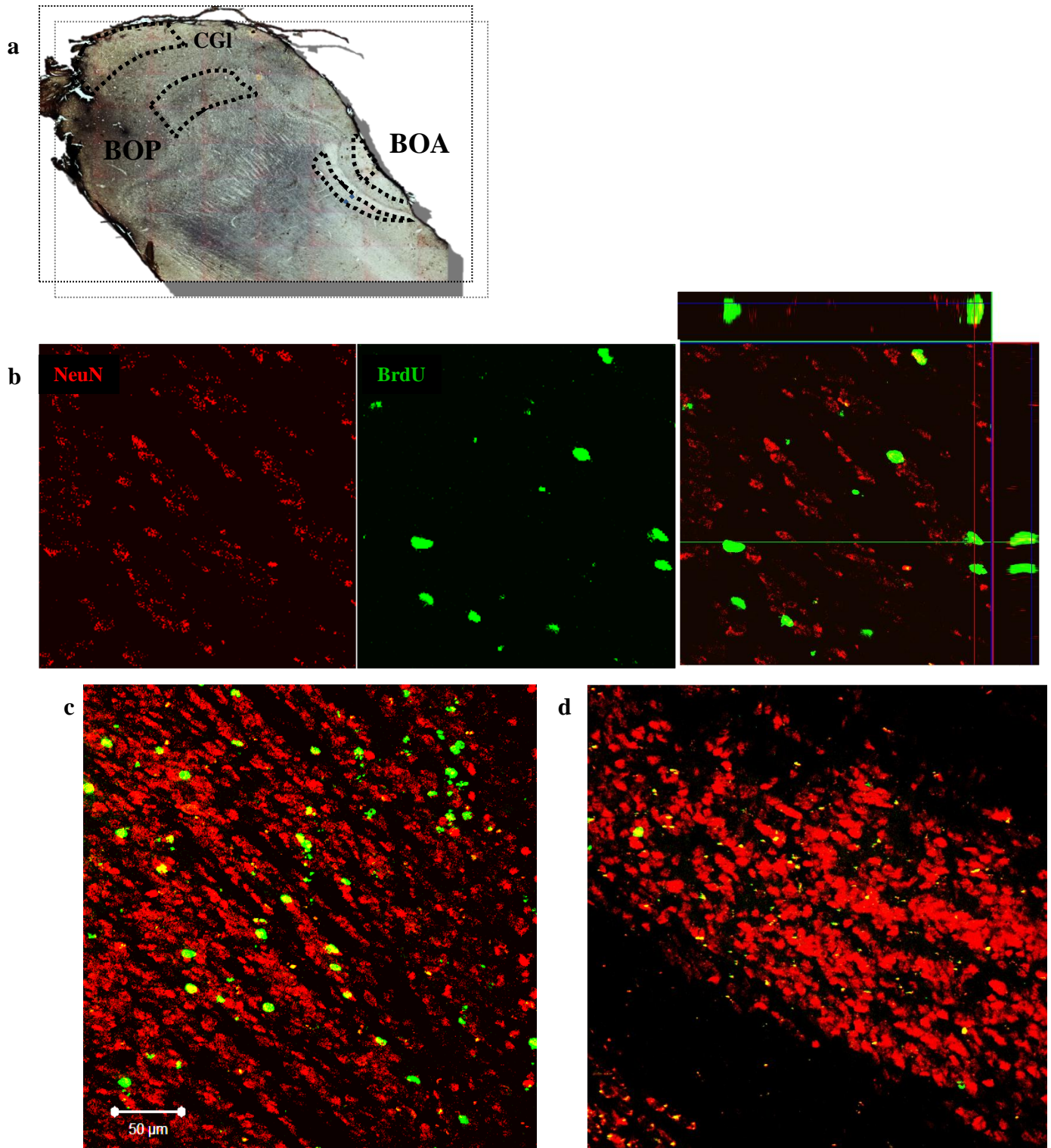


Figura 36. Densidad de células BrdU-ir/mm² en la región anterior y región posterior del Bulbo Olfatorio Accesorio. El análisis realizado de la densidad de células BrdU-ir en las capas celular interna y glomerular, en su región anterior y posterior mostró que no hay diferencias significativas entre los diferentes grupos conductuales.

2.3 Identificación fenotípica de las nuevas células en el BOP y en el BOA

Expresión de NeuN y MAP2b en las células BrdU-ir



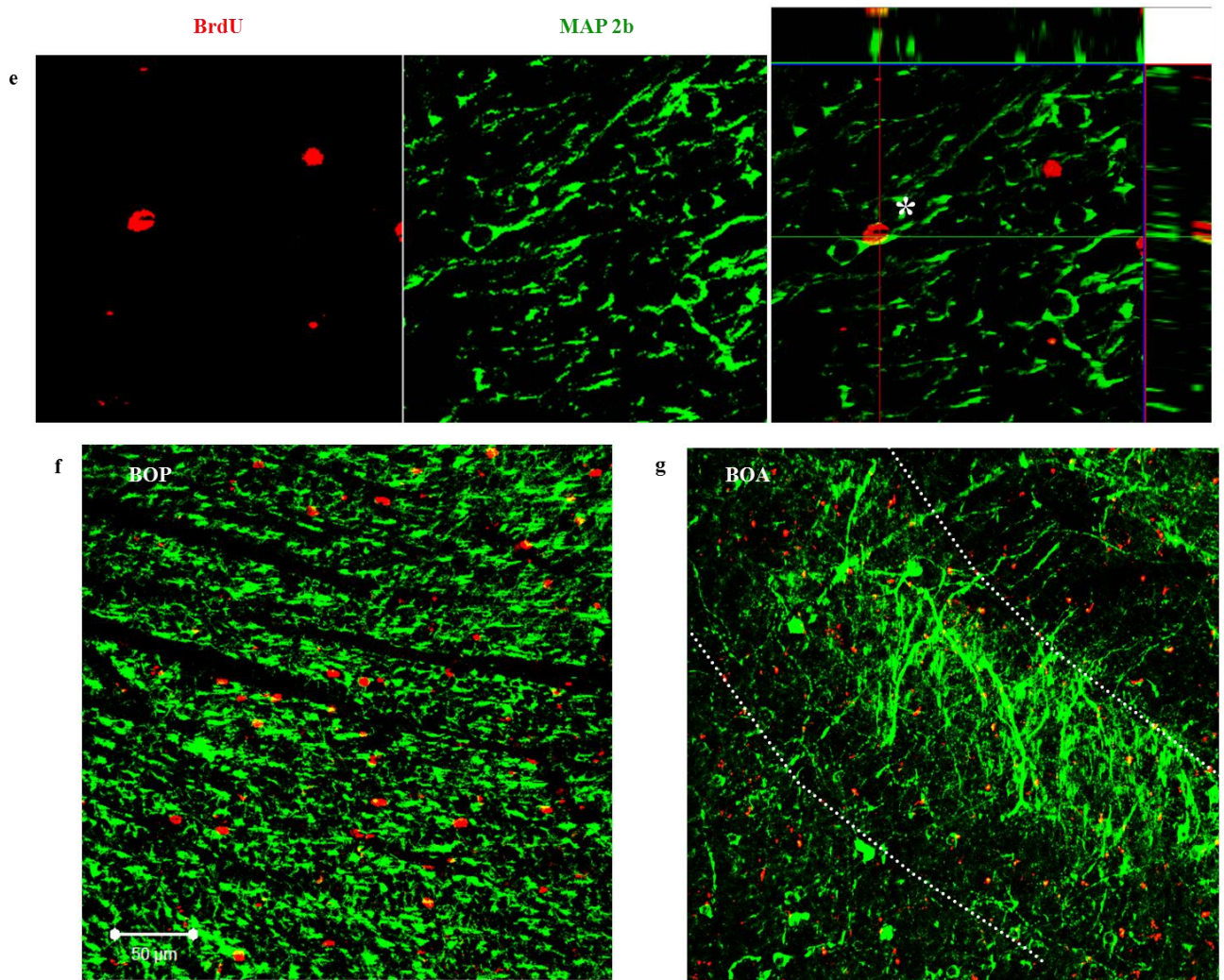


Figura 37. Fotomicrografías representativas de las células BrdU/NeuN-ir (b-d) y BrdU/MAP2b-ir (e-g) localizadas en el BOP y en el BOA. En a) se observa una reconstrucción del Bulbo Olfatorio, donde se observan claramente el Bulbo Olfatorio Principal (BOP) y el Bulbo Olfatorio Accesorio (BOA), y las capas de interés (Glomerular –CGI, Granular –CGr y Celular Interna -CCI). En b) se observa el marcaje de BrdU, NeuN, así como una colocalización con vista ortogonal. En c) y d) una representación de doble marcaje en la CGr del BOP y en la CCI del BOA, respectivamente. En e) se observa el marcaje de BrdU, MAP2b, así como una colocalización con vista ortogonal. En f) y g) una representación de doble marcaje en la CGr del BOP y en la CCI del BOA, respectivamente. La barra corresponde a 50μm.

Porcentaje de células BrdU/NeuN-ir en el BOP y en el BOA (regiones completas)

El porcentaje de células BrdU-ir que también fueron inmunoreactivas a NeuN, se cuantificó y se analizó (ver Figura 43 (b-d) y Tabla 10) obteniendo lo siguiente: el porcentaje de células BrdU/NeuN-ir colocadas en el BOP en la capa granular y en la capa glomerular fue igual para todos los grupos conductuales (K-W: $H(4)=3.634$, $p=0.458$; K-W: $H(4)=1.807$, $p=0.771$; respectivamente).

Así mismo, el porcentaje de células BrdU/NeuN-ir colocalizadas en el BOA en la capa glomerular fue igual para todos los grupos conductuales (K-W: $H(4)=8.781$, $p=0.067$); sin embargo, en la capa celular interna sí se observaron diferencias en las células BrdU/NeuN-ir (K-W: $H(4)=14.372$, $p=0.006$), teniendo un mayor porcentaje de células BrdU/NeuN-ir en el grupo de cópula regulada con respecto al control ($U=0$, $p=0.029$), y un porcentaje menor en el grupo de hembras que fueron expuestas a un macho con respecto al control ($U=0$, $p=0.029$).

Porcentaje de células BrdU/NeuN-ir en el BOA; región anterior y región posterior

El porcentaje de células BrdU/NeuN-ir colocalizadas en las regiones del BOA: anterior y posterior, se analizó para cada uno de los grupos conductuales para evaluar si existe un patrón de supervivencia celular específico.

En la capa celular interna, en su región posterior no se observó ninguna diferencia entre las hembras (K-W: $H(4)=7.964$, $p=0.093$); sin embargo, en la región anterior si se observaron diferencias en el porcentaje de células BrdU/NeuN-ir (K-W: $H(4)=16.234$, $p=0.003$), siendo ambos grupos de conducta sexual, las que no regularon, y las que regularon la cópula los que presentaron el mayor porcentaje, y el grupo de grupos de hembras expuestas a un macho el grupo con menor porcentaje de células BrdU/NeuN-ir colocalizadas en esta región ($U=0$, $p=0.029$; $U=0$, $p=0.029$; $U=0$, $p=0.029$; respectivamente).

En la capa glomerular no se encontraron diferencias entre las hembras en la región posterior, ni en la región anterior (K-W: $H(4)=0.566$, $p=0.967$; K-W: $H(4)=9.059$, $p=0.060$; respectivamente).

Tabla 10. Porcentaje de células BrdU-ir/NeuN-ir en el Bulbo Olfatorio Principal y en el Bulbo Olfatorio Accesorio. Los porcentajes son con respecto a las células BrdU-ir que colocalizaron con las células NeuN-ir. Los datos se expresan como media \pm error estándar.

Regiones		Porcentaje de células BrdU-ir / NeuN-ir				
		Grupos				
		Control	Exposición a Acetato de Amilo	Exposición a un Macho	Cópula No Regulada	Cópula Regulada
BOP	<i>Capa Granular</i>	78.71 \pm 4.8	81.7 \pm 8.5	69.3 \pm 7.5	79.2 \pm 4.5	85.2 \pm 2.3
	<i>Capa Glomerular</i>	33.3 \pm 11.8	25 \pm 14.4	58.9 \pm 22.3	37.5 \pm 23.9	35.4 \pm 14.6
BOA	<i>Capa Celular Interna</i>	19.6 \pm 1.5	16.3 \pm 2.6	11.6 \pm 1.2	26.5 \pm 5	46.1 \pm 11.1
	<i>Capa Glomerular</i>	25 \pm 14.4	76.3 \pm 10.3	37.1 \pm 10.3	18.8 \pm 12	27.1 \pm 10.4
BOA	<i>Capa Celular Interna</i>					
	<i>Anterior</i>	19.8 \pm 1.3	14.8 \pm 2.3	12.5 \pm 1.2*	35.5 \pm 9.5*	37.8 \pm 8.2*
	<i>Posterior</i>	19.5 \pm 2.7	17.8 \pm 4.2	10.8 \pm 3.5	18 \pm 3	55 \pm 19.3
	<i>Capa Glomerular</i>					
	<i>Anterior</i>	13 \pm 12.5	90 \pm 10	28 \pm 11.1	37.5 \pm 23.9	59.5 \pm 21.2
	<i>Posterior</i>	50 \pm 28.8	53 \pm 21	54.3 \pm 20.6	37.5 \pm 23.9	54.2 \pm 20.8

*Exposición a un Macho, Cópula Regulada y Cópula No Regulada diferentes de Control, $p < 0.05$

Expresión de GFAP en las células BrdU-ir

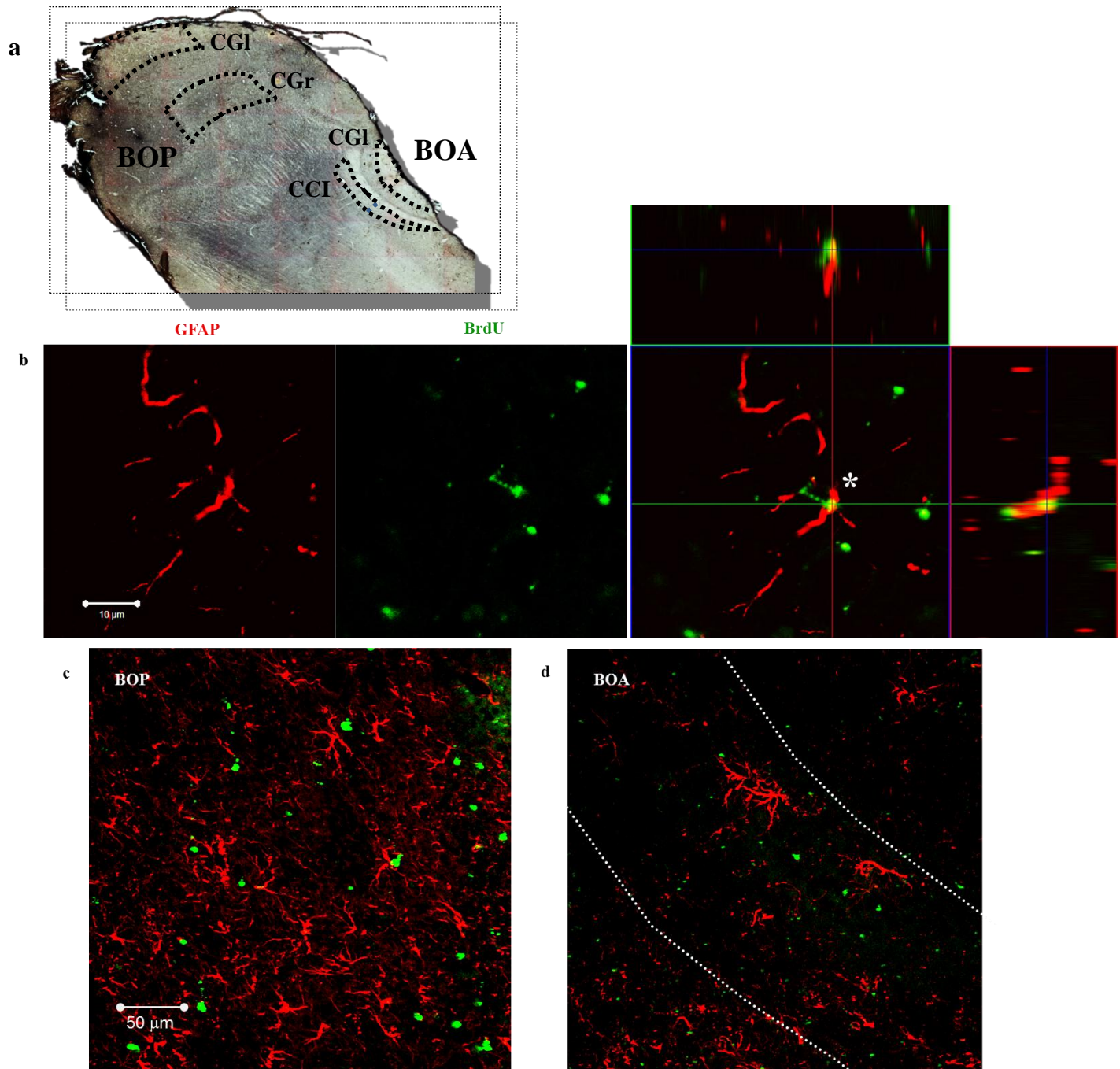


Figura 38. Fotomicrografías representativas de las células BrdU/GFAP-ir localizadas en el BOP y en el BOA. En a) se observa una reconstrucción del Bulbo Olfatorio, donde se observan claramente el Bulbo Olfatorio Principal (BOP) y el Bulbo Olfatorio Accesorio (BOA), y las capas de interés (Glomerular –CGI, Granular –CGr y Celular Interna -CCI). En b) se observa el marcaje de BrdU, GFAP, así como una colocalización con vista ortogonal. En c) y d) una representación de doble marcaje en el BOP y BOA, respectivamente. Las barras corresponden a 10 y 50µm.

Porcentaje de células BrdU/GFAP-ir en el BOP y en el BOA (regiones completas)

El porcentaje de células BrdU-ir que también fueron inmunoreactivas a GFAP, se cuantificó y se analizó (ver Figura 38 y Tabla 11) obteniendo lo siguiente: el porcentaje de células BrdU/GFAP-ir colocadas en el BOP en la capa granular y en la capa glomerular fue igual para todos los grupos conductuales (K-W: $H(4)=4.412$, $p=0.353$; K-W: $H(4)=4.678$, $p=0.322$; respectivamente).

Así mismo, el porcentaje de células BrdU/GFAP-ir colocadas en el BOA en la capa celular interna y en la capa glomerular fue igual para todos los grupos conductuales (K-W: $H(4)=7.095$, $p=0.131$; K-W: $H(4)=3.075$, $p=0.545$; respectivamente).

Porcentaje de células BrdU/GFAP-ir en el BOA; región anterior y región posterior

El porcentaje de células BrdU/GFAP-ir colocadas en las regiones del BOA: anterior y posterior, se analizó para cada uno de los grupos conductuales para evaluar si existe un patrón de supervivencia celular específico.

En la capa celular interna, en la región posterior y en la región anterior no se observó ninguna diferencia entre las hembras (K-W: $H(4)=6.319$, $p=0.177$; K-W: $H(4)=8.278$, $p=0.082$; respectivamente).

En la capa glomerular no se encontraron diferencias entre las hembras en la región posterior, ni en la región anterior (K-W: $H(4)=3.472$, $p=0.482$; K-W: $H(4)=1.911$, $p=0.752$; respectivamente).

Tabla 11. Porcentaje de células BrdU-ir/GFAP-ir en el Bulbo Olfatorio Principal y en el Bulbo Olfatorio Accesorio. Los porcentajes son con respecto a las células BrdU-ir que colocalizaron con las células GFAP-ir. Los datos se expresan como media \pm error estándar.

Regiones		Porcentaje de células BrdU-ir / GFAP-ir				
		Grupos				
		Control	Exposición a Acetato de Amilo	Exposición a un Macho	Cópula No Regulada	Cópula Regulada
BOP	<i>Capa Granular</i>	15.0 \pm 2.6	16.1 \pm 2.9	25.9 \pm 4.8	15.4 \pm 4	21.1 \pm 5.9
	<i>Capa Glomerular</i>	29.6 \pm 10.8	63 \pm 13	21 \pm 13	29.2 \pm 17.2	27.1 \pm 12.5
BOA	<i>Capa Celular Interna</i>	13.5 \pm 3.7	9 \pm 1.1	103.3	15 \pm 2	19 \pm 4.5
	<i>Capa Glomerular</i>	17.1 \pm 5.4	40.2 \pm 11.4	33.5 \pm 13.3	27.1 \pm 10.4	20 \pm 7.6
BOA	<i>Capa Celular Interna</i>					
	<i>Anterior</i>	15.8 \pm 5.2	10 \pm 2	5 \pm 0.4	13 \pm 3.4	18 \pm 8
	<i>Posterior</i>	11.3 \pm 2.5	9 \pm 2	15 \pm 6.2	16 \pm 1.6	20 \pm 7.1
	<i>Capa Glomerular</i>					
	<i>Anterior</i>	5 \pm 5	29.2 \pm 17.2	31.3 \pm 18.8	31.7 \pm 18.3	23 \pm 9
	<i>Posterior</i>	29.2 \pm 14	51.3 \pm 18.3	35.7 \pm 12.0	23 \pm 13.2	18 \pm 12

Expresión de *c-Fos* en las células *BrdU-ir*

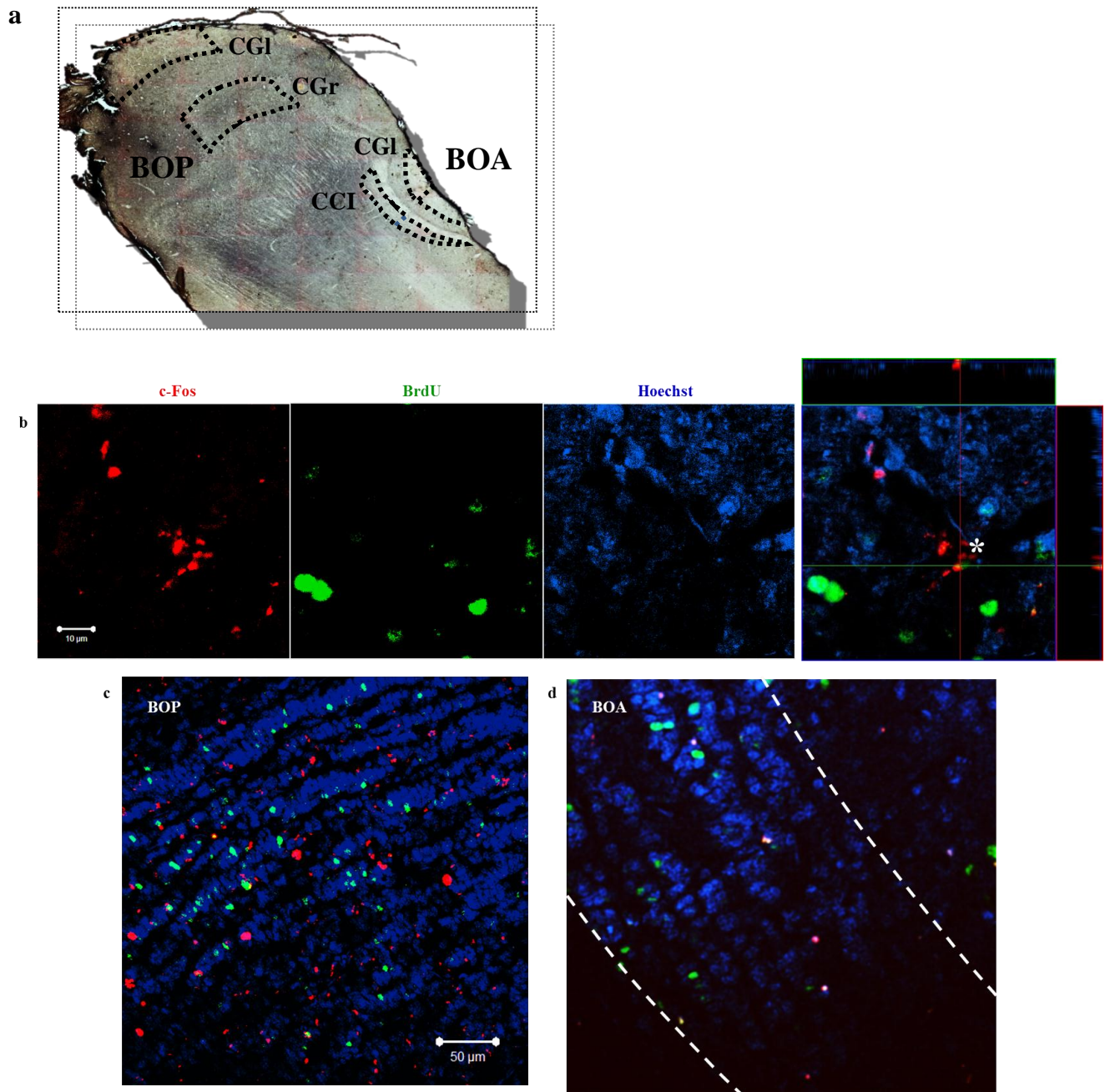


Figura 39. Fotomicrografías representativas de las células *BrdU/c-Fos-ir* localizadas en el BOP y en el BOA. En a) se observa una reconstrucción del Bulbo Olfatorio, donde se observan claramente el Bulbo Olfatorio Principal (BOP) y el Bulbo Olfatorio Accesorio (BOA), y las capas de interés (Glomerular –CGI, Granular –CGr y Celular Interna –CCI). En b) se observa el marcaje de *BrdU*, *c-Fos*, así como una colocalización con vista ortogonal. En c) y d) una representación de doble marcaje en el BOP y BOA, respectivamente. Las barras corresponden a 10 y 50 μm .

Porcentaje de células BrdU/c-Fos-ir en el BOP y en el BOA (regiones completas)

El porcentaje de células BrdU-ir que también fueron inmunoreactivas a c-Fos, se cuantificó y se analizó (ver Figura 39 y Tabla 12) obteniendo lo siguiente: el porcentaje de células BrdU/c-Fos-ir colocalizadas en el BOP en la capa granular y en la capa glomerular fue igual para todos los grupos conductuales (K-W: $H(4)=5.351$, $p=0.253$; K-W: $H(4)=7.549$, $p=0.110$; respectivamente).

Sin embargo, en el porcentaje de células BrdU/c-Fos-ir colocalizadas en el BOA en la capa celular interna y en la capa glomerular si hubo diferencias entre los grupos conductuales (K-W: $H(4)=9.757$, $p=0.045$; K-W: $H(4)=12.209$, $p=0.032$; respectivamente). En la capa celular interna, el grupo de hembras que regularon la cópula presentaron un mayor porcentaje de células colocalizadas con respecto al grupo de hembras control ($U=0$, $p=0.029$), y en la capa glomerular, el grupo de hembras que no regularon la cópula presentó el porcentaje más alto de células colocalizadas con respecto al control ($U=0$, $p=0.029$).

Porcentaje de células BrdU/c-Fos-ir en el BOA; región anterior y región posterior

El porcentaje de células BrdU/c-Fos-ir colocalizadas en las regiones del BOA: anterior y posterior, se analizó para cada uno de los grupos conductuales para evaluar si existe un patrón de activación celular específico.

En la capa celular interna, si hubo una diferencia en el porcentaje de células colocalizadas en la región anterior (K-W: $H(4)=10.348$, $p=0.035$), siendo el grupo de hembras que regularon la cópula las de mayor porcentaje con respecto a las hembras control ($U=0$, $p=0.029$). En la región posterior de la capa celular interna no se observó ninguna diferencia entre las hembras (K-W: $H(4)=6.576$, $p=0.160$). En la capa glomerular, si hubo una diferencia en el porcentaje de células colocalizadas en la región anterior (K-W: $H(4)=10.439$, $p=0.034$), siendo las hembras que no regularon la cópula y las hembras que regularon la cópula, las de mayor porcentaje con respecto a las hembras control ($U=0$, $p=0.029$; $U=0$, $p=0.029$; respectivamente). En la región posterior de la capa celular interna no se observó ninguna diferencia entre las hembras (K-W: $H(4)=7.201$, $p=0.126$).

Tabla 12. Porcentaje de células BrdU-ir/c-Fos-ir en el Bulbo Olfatorio Principal y en el Bulbo Olfatorio Accesorio. Los porcentajes son con respecto a las células BrdU-ir que colocalizaron con las células c-Fos-ir. Los datos se expresan como media \pm error estándar.

Regiones		Porcentaje de células BrdU-ir / c-Fos-ir				
		Grupos				
		Control	Exposición a Acetato de Amilo	Exposición a un Macho	Cópula No Regulada	Cópula Regulada
BOP	<i>Capa Granular</i>	32.2 \pm 12.3	51.4 \pm 3.3	28 \pm 10	32.2 \pm 9	47.1 \pm 5
	<i>Capa Glomerular</i>	25.3 \pm 11.8	40 \pm 7	32.6 \pm 6.3	60.4 \pm 7.5	60 \pm 16.3
BOA	<i>Capa Celular Interna</i>	35.1 \pm 5.4	30.1 \pm 8.5	36.2 \pm 3.7	49.4 \pm 7.5	65.1 \pm 8*
	<i>Capa Glomerular</i>	18.1 \pm 7.2	36.5 \pm 2.1	27 \pm 7	59.1 \pm 5.6 ⁺	49.2 \pm 13
BOA	<i>Capa Celular Interna</i>					
	<i>Anterior</i>	26.8 \pm 7.5	28 \pm 10	47.1 \pm 5	59 \pm 15	64.3 \pm 4.2*
	<i>Posterior</i>	43.3 \pm 3.6	32.2 \pm 9	25.3 \pm 11.8	40.1 \pm 10	66 \pm 12
	<i>Capa Glomerular</i>					
	<i>Anterior</i>	12 \pm 8	27.4 \pm 7.1	23 \pm 11.1	54 \pm 5 ^a	68 \pm 15 ^a
	<i>Posterior</i>	24.4 \pm 12	46 \pm 8.0	31.5 \pm 7.7	65 \pm 8.6	31 \pm 12.2

*Cópula Regulada diferente de Control, $p < 0.05$

⁺Cópula No Regulada diferente de Control, $p < 0.05$

^aCópula Regulada y Cópula No Regulada diferentes de Control, $p < 0.05$

2.5 Resumen de resultados (Experimento 2)

Conducta sexual

Las hembras realizaron dos pruebas de conducta sexual en total para este experimento. La primera prueba, la realizaron cuando se les administró el marcador BrdU, y la segunda prueba, 45 días después (mismo día del sacrificio). Las pruebas tuvieron una duración de 1 hora, en la cual, las hembras permanecieron igualmente receptivas en ambos grupos: cuando regularon la cópula y cuando no la regularon (sin diferencias en IML y CL). El tiempo que pasó entre una estimulación y otra (III) no fue distinto en las hembras que regularon la cópula comparado con las hembras que no regularon la cópula.

La cantidad de estimulación que las hembras recibieron, en ambos grupos y en las dos pruebas fue igual con respecto a las intromisiones y eyaculaciones que recibieron por parte del macho. El número de montas, sin embargo, varió en la segunda prueba conductual (día 45) entre las hembras que regularon la cópula y las que no la regularon. Así mismo, el tiempo que tardaron los machos en iniciar los contactos sexuales con las hembras de ambos grupos fue el mismo (latencias de montas, intromisiones y eyaculaciones).

Supervivencia celular en el BOP y el BOA

La densidad de células nuevas (BrdU-ir) en la BOP fue igual para todos los grupos de hembras. En el BOA (región completa) y regiones anterior y posterior, la densidad de células nuevas (BrdU-ir) fue igual para todos los grupos de hembras..

El porcentaje de células nuevas (BrdU-ir) que fueron inmunoreactivas también a NeuN (neuronas-nuevas) en el BOP fue igual en la capa granular y en la capa glomerular de todos los grupos de hembras. En el BOA, el porcentaje de células con colocación de BrdU/NeuN-ir fue igual para todos los grupos en la capa glomerular. Sin embargo, en la capa celular interna, el porcentaje de células BrdU/NeuN-ir fue mayor en el grupo de cópula regulada por la hembra comparado con el control.

En las regiones anterior y posterior de la capa celular interna del BOA, encontramos que: en la región anterior el porcentaje de células BrdU/NeuN-ir fue mayor en los dos grupos de hembras que realizaron cópula con respecto al control, y menor en el grupo de hembras expuestas a un macho. En la región posterior no se observaron diferencias entre los diferentes grupos.

En las regiones anterior y posterior de la capa glomerular del BOA no se encontraron diferencias en el porcentaje de células BrdU/NeuN-ir entre grupos.

El porcentaje de células nuevas (BrdU-ir) que fueron inmunoreactivas también a GFAP (glía-nueva) en el BOP fue igual en la capa granular y en la capa glomerular de todos los grupos de hembras. En el BOA, el porcentaje de células con colocación de BrdU/GFAP-ir fue igual para todos los grupos en la capa glomerular y en la capa celular interna.

En las regiones anterior y posterior de la capa celular interna, y de la capa glomerular del BOA el porcentaje de células BrdU/GFAP-ir fue igual en todos los grupos.

El porcentaje de células nuevas (BrdU-ir) que fueron inmunoreactivas también a c-Fos (células nuevas activadas) en el BOP fue igual en la capa granular y en la capa glomerular de todos los grupos de hembras. En el BOA, el porcentaje de células con colocación de BrdU/c-Fos-ir en la capa glomerular fue mayor en las hembras que no regularon la cópula con respecto a las hembras control. En la capa celular interna, el porcentaje de colocación de BrdU/c-Fos-ir fue mayor en las hembras que regularon la cópula con respecto al control.

En la región anterior de la capa celular interna del BOA el porcentaje de células BrdU/c-Fos-ir fue mayor en el grupo de cópula regulada con respecto al control. Sin embargo, en la región posterior de la capa celular interna no hubo diferencia en el porcentaje entre los grupos.

En la región anterior de la capa glomerular del BOA el porcentaje de células BrdU/c-Fos-ir fue mayor en los dos grupos de cópula con respecto al control. Sin embargo, en la región posterior de la capa glomerular no hubo diferencia en el porcentaje entre los grupos.

X. DISCUSIÓN

1. Experimento 1

En el experimento 1 evaluamos el efecto de la cópula regulada sobre la proliferación celular que ocurre en la ZSV y en la VMR. La cópula regulada incrementó la densidad de células nuevas solamente en la VMR. Este efecto específico observado en la VMR y no en la ZSV es consistente con lo que Díaz y cols (2012) encontraron al demostrar que la preñez y la sincronización en etapa de estro (etapa de receptividad sexual) incrementan la proliferación de la VMR y la del bulbo olfatorio, sin mostrar ningún efecto en la ZSV. Este efecto lo atribuyen al incremento en las fibras serotoninérgicas localizadas en la VMR, ya que este incremento no se observa en los machos ni en hembras que no tuvieran estas dos condiciones (preñez o estro). Además, el incremento observado en la VMR por Díaz y cols (2012) no se debe a una disminución en la muerte celular de estas células nuevas.

Por otro lado, nuestros resultados y los del grupo de Díaz y cols., (2012) son contradictorios con lo encontrado por el grupo de Shingo y cols., (2003), ya que ellos demostraron, en un trabajo con ratones que la preñez estimula la producción de progenitores neurales de la ZSV y no en la VMR. De igual forma observaron que las hembras que copularon con machos estériles también mostraron estos cambios en la proliferación celular, sugiriendo entonces que la proliferación celular que ocurre en la ZSV contribuye de manera importante en conductas adaptativas como lo son la cópula y la preñez. Las diferencias en estos resultados pueden deberse a varios factores, primero nosotros observamos cambios en la rata hembra, así como Díaz y cols (2012), sin embargo, en el trabajo de Shingo y cols (2003) observaron los cambios en ratones; segundo, los tiempos de administración del marcador BrdU que fueron diferentes en cada experimento.

Nuestros resultados también muestran que la proliferación de la ZSV se incrementó después de la estimulación olfatoria, hembras expuestas a un macho y expuestas a acetato de amilo. Este incremento en la proliferación celular entre los grupos con estímulo olfatorio fue igual entre ellos, aun cuando el tipo de estimulación olfatoria fue diferente, siendo uno de tipo sexual y otro de tipo general. Esto es muy interesante y consistente con varios trabajos.

Las hembras que estuvieron expuestas a un macho sexualmente experto, mostraron un claro incremento en la proliferación de la ZSV, lo cual es consistente con lo observado por el grupo de

Mak y cols. (2007). Ellos demostraron que la exposición prolongada (2 a 7 días) a ratones hembras con olores provenientes de ratones machos dominantes (siempre el mismo macho para cada hembra) también incrementó significativamente la proliferación celular de la ZSV así como la proliferación que ocurre en el giro dentado del hipocampo. Debido a que este incremento no se observó en hembras que fueron expuestas a machos gonadectomizados (sin testosterona circulante), los autores propusieron que las feromonas del macho, que se encuentran directamente relacionadas con la testosterona, proveen de la estimulación sensorial que produce el incremento en la proliferación celular (Mak, Enwere et al. 2007). El efecto observado en la proliferación celular de la ZSV y del giro dentado está mediado por el procesamiento del sistema olfatorio principal, ya que al exponer hembras tratadas con $ZnSO_4$ que destruye al epitelio olfatorio principal, a olores de machos dominantes intactos, éstas no mostraron el incremento en la proliferación. Al parecer, la proliferación de células en la ZSV de las hembras se ve incrementada tras la exposición olfatoria de claves sexualmente relevantes, sin importar si el estímulo es presentado por única ocasión (como en el presente trabajo), o durante varios días (2 a 7 días en el caso de Mak y cols. (2007)). Por lo tanto, el incremento en la proliferación celular de la ZSV podría deberse a la novedad en el estímulo olfatorio sexual del macho y/o a la adquisición de una nueva memoria olfativa generada por olores provenientes del macho.

Nuestros resultados también mostraron que las hembras que estuvieron expuestas al olor de acetato de amilo incrementaron la proliferación celular de la ZSV. Sin embargo existe evidencia de que el enriquecimiento olfatorio, utilizando veinte olores naturales diferentes y novedosos para los ratones no incrementan la proliferación celular de la ZSV (Rocheffort, Gheusi et al. 2002). Las discrepancias en estos resultados puede deberse a varios factores. En este trabajo utilizamos ratas hembra, que sólo fueron expuestas al olor de acetato de amilo por una vez, durante un periodo largo (1hr), lo cual hace que este estímulo fuera agudo, novedoso y único; además, la administración de BrdU que nosotros hicimos se realizó antes y después de la prueba, en el mismo día, y el sacrificio se realizó dos días después, por lo que las células nuevas tuvieron tiempo suficiente de proliferar e incorporar el BrdU. Por otro lado, el enriquecimiento olfatorio utilizado por el grupo de Rocheffort y cols. (2002) se realizó durante 20 días, y utilizaron ratones macho, los cuales tuvieron tiempo de familiarizarse con los olores antes de la administración del BrdU, que se realizó al final del periodo de enriquecimiento, y fueron sacrificados 4 horas después de la administración de BrdU, por lo que las células nuevas que proliferaron solo tuvieron tiempo para realizar un ciclo celular, y por lo tanto la cantidad de células BrdU observadas en la ZSV fue más limitada (Rocheffort, Gheusi et al. 2002).

Por otro lado, se ha demostrado también que no sólo la exposición a ciertos olores puede promover cambios en la proliferación celular de la ZSV, así por ejemplo el periodo temprano del parto, en un modelo de cabras, promueve una disminución en la proliferación celular en la ZSV (Brus, Meurisse et al. 2010), sugiriendo así que existen varios estímulos olfatorios exclusivamente o algunas conductas que involucran el olfato que pueden mediar la proliferación celular de esta región.

En el proceso de proliferación celular en el cerebro adulto, existen muchos factores involucrados, y como nuestros resultados lo sugieren podemos decir que los estímulos olfatorios generales y novedosos, los estímulos olfatorios de tipo sexual, la conducta sexual, la preñez, la prolactina, y la serotonina pueden promover una mayor proliferación. Sin embargo, no son los únicos factores involucrados y no podemos dejar a un lado a las hormonas que más se han relacionado con cambios plásticos, las hormonas ováricas.

Se sabe que en las ratas adultas, los estrógenos son capaces de incrementar la formación de espinas dendríticas, la sinaptogenesis y la neurogenesis que ocurre en el hipocampo (Tanapat, Galea et al. 1998). La proliferación celular del giro dentado del hipocampo incrementa durante la etapa de proestro (etapa donde los niveles de estrógenos se elevan), ya que la ovariectomía disminuye este incremento en la proliferación. El tratamiento con estrógenos a ratas ovariectomizadas incrementa la proliferación celular, mientras que el tratamiento con progesterona o progesterona más estradiol elimina el efecto del incremento en la proliferación (Gould, Tanapat et al. 2000). Se ha propuesto que los estrógenos pudieran estar actuando vía factores de crecimiento para regular la proliferación celular, en particular a través de su acción sobre la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y del factor de crecimiento neural (NGF) (Moyses, Bauer et al. 2006).

En la VMR, por otro lado, los estrógenos parecen tener también un efecto positivo en la proliferación celular. En perros de la pradera hembras, el estado de estro inducido por el contacto con el macho promueve el incremento en la proliferación celular de la VMR (Smith, Pencea et al. 2001). En este trabajo, el primer estro inducido en las hembras fue evaluado para ver sus efectos en la proliferación celular, y se encontró una asociación entre este estado y los niveles elevados de estrógenos, por lo que sugieren que los estrógenos pudieran estar promoviendo el incremento en la proliferación celular de esta región, ya que hembras ovariectomizadas que son expuestas a los machos no mostraron este incremento (Smith, Pencea et al. 2001).

En el presente trabajo, analizamos también en qué región particular de la ZSV y de la VMR se observó la mayor proliferación para tener una evidencia del tipo de células que pudieran estar proliferando ante un estímulo específico. En estudios recientes se ha demostrado que el destino de las células nuevas que se generan en la ZSV y/o en la VMR está determinado por la información que le provee el sitio donde son generadas, por lo que se ha regionalizado a la ZSV y a la VMR para su estudio de manera más específica. También se ha descrito mediante análisis de destino a partir de trasplantes heterotípicos de las células progenitoras neurales a lo largo de la ZSV y de la VMR que las células nuevas tienen un potencial limitado para generar ciertos tipos de interneuronas del bulbo olfatorio (Merkle, Mirzadeh et al. 2007; Whitman and Greer 2009).

Mediante la inyección específica en diferentes sitios de la ZSV y de la VMR usando adenovirus se logró identificar el destino final de las células que llegan al bulbo olfatorio a partir de los diferentes sitios de generación: siendo las regiones más dorsales las que producen las interneuronas periglomerulares de tipo TH+, y las granulares superficiales, las regiones ventrales las que producen las interneuronas periglomerulares de tipo calbindina+ (CalB+), y las granulares profundas, y las regiones anteriores las que producen las interneuronas periglomerulares de tipo calretinina+ (CalR+), y la mayor parte de las granulares (Merkle, Mirzadeh et al. 2007; Whitman and Greer 2009).

Nuestros resultados mostraron que las hembras que estuvieron expuestas por única ocasión a un estímulo olfatorio, ya sea a un macho o al olor del acetato de amilo tuvieron un incremento en la proliferación celular en la región ventral de la ZSV. De acuerdo a lo descrito previamente, las células que se generan en la región ventral de la ZSV son en su mayoría interneuronas periglomerulares CalB+ e interneuronas granulares profundas (Merkle, Mirzadeh et al. 2007; Whitman and Greer 2009). Nuestros resultados sugieren que los estímulos olfatorios podrían estar promoviendo la proliferación de interneuronas periglomerulares CalB+ y granulares profundas. En la VMR, las hembras que tuvieron su primer contacto sexual, en cópula regulada o en cópula no regulada, mostraron un incremento en la proliferación celular en la región anterior. La región anterior de la VMR genera en su mayoría interneuronas granulares (superficiales y profundas), así como interneuronas periglomerulares de tipo CalR+.

Si bien es cierto, no podemos asegurar que en efecto estos estímulos estén generando este tipo particular de células que finalmente poblarán el bulbo olfatorio, ya que no se utilizaron técnicas que nos permitieran marcar y dar seguimiento al linaje celular para la identificación de células en su

destino final, sin embargo, es muy claro que hubo un incremento en la proliferación celular y que éste incremento fue en un sitio específico, por lo que consideramos que sería muy interesante investigar en futuros experimentos el destino celular de las células que proliferan más ante un estos y otros tipos de estímulos.

En este trabajo evaluamos también el porcentaje de células nuevas, recién proliferadas con un compromiso neuronal definido (neuroblastos -células DCX+) en la ZSV y en la VMR. En la región anterior de la ZSV, más del 70% de las nuevas células fueron neuroblastos en las hembras que estuvieron expuestas a estímulos olfatorios comparado con un 30% que tuvieron las hembras control (nuestra línea base de producción de neuroblastos). En la VMR no observamos diferencias en el porcentaje de neuroblastos nuevos comparado con nuestras hembras control (50% de neuroblastos), sin embargo entre los grupos sí hubo algunas diferencias, como en la región posterior, más del 70% de las células nuevas fueron neuroblastos en las hembras que estuvieron expuestas a acetato de amilo con respecto a las hembras expuestas a un macho y a las hembras que regularon la cópula (30% de neuroblastos aproximadamente). Estos resultados sugieren que la exposición olfatoria promueve que las nuevas células se comprometan al linaje neuronal en la ZSV anterior, y también en la región posterior de la VMR. Esta última constituye la continuación (extensión rostral) de la región anterior de la ZSV, por lo que es esta zona continua (ZSV anterior y VMR posterior) en general la que parece ser más sensible al compromiso a linaje neuronal después de estímulos olfatorios. Estos resultados son consistentes con lo observado en ratonas después de la exposición durante 7 días a feromonas de machos dominantes lo cual promueve un 55% de incremento de células DCX+ en la ZSV e incluso un 30% en el giro dentado del hipocampo. Este incremento en la proliferación celular fue específico tras la exposición a feromonas de machos, ya que cuando expusieron a las hembras a olores de machos castrados no se observó el mismo incremento (Mak, Enwere et al. 2007).

Así mismo, evaluamos el porcentaje de células nuevas (BrdU+) que expresaran también GFAP+, utilizado para identificar a las células gliales (astrocitos) y, como un indicador de células progenitoras o células tipo B en esta etapa del proceso de neurogénesis (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo 2002; Coria-Avila, Jones et al. 2006). En la etapa en la que nosotros evaluamos la expresión de GFAP (a los 2 días de que las células nacieron), éste marcador se utiliza exclusivamente como indicador de las células progenitoras ó células de tipo B (Chojnacki, Mak et al. 2009).

En la ZSV región medial-anterior las hembras que realizaron conducta sexual sin regular los contactos tuvieron más del 70% de células GFAP+ con respecto al grupo de hembras control que sólo tuvo un 40%. Sin embargo, en la región ventral de la ZSV, este mismo grupo de hembras que no regularon los contactos sexuales mostró el porcentaje más bajo (menos del 10%) de células GFAP+, mientras que las hembras que estuvieron expuestas a un macho mostraron el porcentaje más alto (más del 60%) con respecto a las hembras control (30% de células GFAP+).

En la VMR no se observaron diferencias en el porcentaje de células progenitoras. Esto sugiere entonces, que la conducta sexual no regulada por la hembra promueve efectos diferenciales en la proliferación de células GFAP+ en las regiones de la ZSV, incrementándola en la región medial-anterior y disminuyéndola en la región ventral, mientras que la exposición de las hembras a un macho aumenta la proliferación de células GFAP+ en la región ventral de la ZSV. El porcentaje que nosotros observamos de células nuevas (BrdU+) que expresaron GFAP fue de un 30% en hembras control sin ninguna estimulación, difiere un poco de lo que se ha reportado en roedores (Doetsch, Caille et al. 1999; Lledo, Alonso et al. 2006; Merkle, Mirzadeh et al. 2007) y en cabras (Coria-Avila and Pfau 2007) donde se encuentra que un 40 a 50% de las células nuevas expresan GFAP en la ZSV y en la VMR. Esta diferencia quizás se deba a los diferentes tiempos de evaluación de células GFAP+ ó células progenitoras. Nosotros observamos un 30% de células GFAP+ a las 48 horas después de la administración del BrdU, y en los otros trabajos observaron un 40-50% 24 horas después de la administración del BrdU, por lo que quizás estemos viendo un efecto normal de la dinámica de las células GFAP+ en donde disminuyen en porcentaje conforme el tiempo transcurre, ya sea porque las células van adquiriendo un compromiso de linaje y dejan de ser células GFAP+ (progenitoras indiferenciadas) o porque pasan un pico de producción a las 24 horas. Estas posibilidades no han sido evaluadas aún.

2. Experimento 2

La evaluación de la supervivencia celular en el bulbo olfatorio la realizamos cuarenta y cinco días después de la administración del BrdU, lo que nos permitió determinar que las células que encontramos en el bulbo olfatorio son células que sobrevivieron. El marcador BrdU se administró el mismo día de las pruebas conductuales. Tanto en el BOP como en el BOA, la supervivencia celular fue la misma en las hembras de los diferentes grupos, por lo que una sola estimulación olfatoria o un único encuentro sexual no aumenta significativamente la supervivencia de las células nuevas. Esto pudiera explicarse desde dos puntos: 1) la estimulación olfatoria y la conducta sexual que estas hembras realizaron fue de una sola sesión, es decir, estas hembras no tuvieron oportunidad de generar una memoria con respecto al estímulo olfatorio utilizado o con respecto a la pareja con la que estuvieron en contacto dado el corto tiempo de exposición, y 2) nuestra evaluación se realizó con base en el conteo de células BrdU+ localizadas en el BOP y en el BOA, y éste marcador se administró en el mismo día que se realizó la prueba conductual. Podemos sugerir que el efecto de una sola estimulación olfatoria y/o un sólo encuentro sexual realizado el mismo día en el que se reproducen las células de interés promueve la proliferación celular, sin embargo no tiene un efecto a largo plazo, es decir, no promueve la supervivencia celular. Con respecto a la conducta sexual, dado que los parámetros evaluados no reflejaron diferencias significativas en la cantidad y temporalidad de la estimulación que la hembra recibe por parte del macho (III) en cópula regulada y cópula no regulada, podemos pensar que ésta también sea una razón por la que no se observan diferencias en la supervivencia de las células nuevas.

Estos resultados concuerdan con lo que se ha reportado en donde se describe que el proceso de generación de nuevas células en el bulbo olfatorio, tiene diferentes fases o etapas críticas por la que las células tienen que pasar hasta llegar a su destino. Estas etapas son: proliferación celular, migración celular y supervivencia celular, y cada una de estas etapas esta finamente regulada (Petreanu and Alvarez-Buylla 2002; Ming and Song 2005; Lledo, Alonso et al. 2006; Lledo 2008).

Los estímulos olfatorios y la conducta sexual afectan de manera diferente a las etapas de este proceso, ya que, el experimento 1 nos permitió conocer que los estímulos olfatorios promueven la proliferación celular en la ZSV y la conducta sexual promueve la proliferación celular de la VMR. No obstante, en el experimento 2, en donde se utilizaron los mismos estímulos olfatorios y la conducta sexual, vemos que no hubo cambios en la supervivencia celular, por lo que el efecto de

estos estímulos y conducta parecen ser a corto plazo únicamente. Por otra parte, el tiempo que requieren las células nuevas para llegar al bulbo olfatorio, incorporarse a los circuitos celulares preexistentes y sobrevivir es de 45 días (Petreanu and Alvarez-Buylla 2002; Ming and Song 2005). Nosotros demostramos recientemente como un único contacto sexual promueve una mayor incorporación de células nuevas al bulbo olfatorio, en particular al BOA, evaluado a los 15 días después del estímulo (Corona, Larriva-Sahd et al. 2011). Teniendo este antecedente, y sabiendo que la conducta sexual también promueve una mayor proliferación celular en la VMR, podemos pensar, que un único encuentro sexual no es capaz de promover la supervivencia celular, por lo que es entre el día 15 y el día 45 que se están perdiendo éstas células. Esto puede explicarse ya que las neuronas nuevas que tienen de 15 a 22 días de nacidas ya muestran una morfología madura, lo que implica que éstas neuronas ya reciben conexiones de las células mitrales y empenachadas, y a su vez esto sugiere que la actividad de las células mitrales y empenachadas pudieran estar regulando la supervivencia de las neuronas recién incorporadas al circuito del bulbo olfatorio (Petreanu and Alvarez-Buylla 2002). Si durante este tiempo las nuevas neuronas no reciben información, es decir, los animales no son sometidos a algún tipo de estimulación olfatoria o a alguna conducta que requiera de la función o actividad de las células principales del bulbo olfatorio (células mitrales y empenachadas), éstas células probablemente se pierdan y no sobrevivan.

Ya se ha demostrado que en ratones que tienen una mutación en un nucleótido del canal que transduce la señal olfatoria en las neuronas olfativas sensoriales del epitelio olfatorio no son capaces de procesar la información olfatoria, ya que carecen de toda actividad eléctrica en las neuronas olfativas sensoriales y no pueden enviar información al bulbo olfatorio. El bulbo olfatorio a su vez carece entonces de toda información olfativa, por lo que a éstos animales se les considera anósmicos (Kleitz-Nelson, Dominguez et al. 2010). Los bulbos olfatorios de estos ratones son pequeños debido a una pérdida constante de células nuevas granulares, ya que mediante la administración del BrdU y de [H_3] timidina a diferentes tiempos y un análisis con la técnica de TUNEL se ha visto que la mayoría de las células granulares nuevas en los animales anósmicos se perdieron entre los días 15 y 45 después de nacidas, lo que nuevamente nos sugiere que es en éste periodo cuando se requiere de actividad olfatoria para promover la supervivencia celular (Petreanu and Alvarez-Buylla 2002).

Ahora bien, en nuestro trabajo las hembras que tuvieron conducta sexual en el paradigma de cópula regulada en el día 0 (día de administración de BrdU), tuvieron una mayor incorporación de células nuevas al bulbo olfatorio 15 días después de haber sido generadas (Corona, Larriva-Sahd et al. 2011), pero este único evento de conducta sexual no fue capaz de promover que estas células

nuevas sobrevivieran el periodo crítico de muerte celular y se mantuvieran ahí hasta los 45 días. Esto nos indica que para la migración de las células nuevas y que lleguen al bulbo olfatorio no se requiere de constante actividad olfatoria, sin embargo, para la supervivencia celular sí se requiere de actividad constante durante el periodo crítico (15 a 45 días); así mismo, en nuestro grupo de trabajo recientemente demostramos que la cópula repetida durante los primeros 15 días de vida de las células promueve el incremento en las células nuevas en las dos regiones del bulbo olfatorio (principal y accesorio) (Hurtazo and Paredes 2005), lo que nos sugiere que probablemente la cópula repetida pudiera también aumentar la supervivencia celular. Esto es consistente con lo observado en ratones anósmicos, en donde demuestran que la ausencia de actividad olfatoria promueve una pérdida de células nuevas en el bulbo olfatorio, pero no hay ninguna pérdida celular en la VMR, por lo que sigue existiendo la misma llegada celular al bulbo olfatorio por la VMR y es en el bulbo olfatorio donde éstas mueren (Petreanu and Alvarez-Buylla 2002).

Por otro lado, en este trabajo evaluamos la influencia de la conducta sexual en la determinación del linaje de las células nuevas, ya que una vez que las células han proliferado pueden comprometerse con un linaje neuronal o un linaje glial (Hack, Saghatelian et al. 2005). Nuestros resultados indican que en la capa celular interna del BOA, este porcentaje fue mayor en las hembras que realizaron conducta sexual regulada (46%) y menor en el grupo de hembras expuestas a un macho (12%) en comparación con las hembras control (20%). Este incremento en el porcentaje de neuronas nuevas se observó específicamente en la región anterior de la capa celular interna del BOA, en donde las hembras que regularon la cópula y las que no regularon la cópula tuvieron un mayor porcentaje de neuronas nuevas (38% y 36%, respectivamente) con respecto a las hembras control (20%), y las hembras expuestas a un macho tuvieron una baja en el porcentaje, con un 13% únicamente de neuronas nuevas. Estos resultados sugieren que, la conducta sexual realizada en el día 0 de las células nuevas, promueve la determinación del linaje neuronal en la capa celular interna del BOA. El porcentaje de neuronas nuevas (células BrdU⁺/NeuN⁺) encontradas en la capa granular (80%) y en la capa glomerular (30%) del BOP y en la capa glomerular (25%) del BOA fue igual para todas las hembras a los 45 días.

También evaluamos el porcentaje de células nuevas que expresaran la proteína glial GFAP, como indicador de células gliales, específicamente de astrocitos. Encontramos que tanto en la capa granular (15%), la capa glomerular (30%) del BOP, así como la capa glomerular (17%) y la celular interna (14%) del BOA, el porcentaje de células gliales nuevas fue el mismo para todos. Esto sugiere que la conducta sexual no promueve la determinación del linaje glial en las células nuevas.

Como previamente se mencionó, la preñez temprana en ratonas y la lactancia tienen un efecto claro sobre la proliferación celular de la ZSV aparentemente mediado por la hormona prolactina, y el factor de crecimiento epidérmico (EGF), sin embargo, Shingo y cols. (2003) también observaron en cultivos de células progenitoras que la administración de prolactina más EGF promueve e incrementa la formación de neuronas, por lo que se sugiere que los procesos neuroendocrinos involucrados con la maternidad y la lactancia pueden promover la proliferación celular y el compromiso neural de estas células nuevas (Shingo, Gregg et al. 2003). Por otro lado ratonas hembras expuestas a feromonas provenientes de machos dominantes incrementan el número de neuronas nuevas (células BrdU⁺/NeuN⁺) del BOP. Al parecer, esta exposición previa a las feromonas del macho dominante promueve la preferencia de las hembras por machos dominantes, por lo que es posible que las neuronas nuevas del bulbo olfatorio estén involucradas en la preferencia de pareja de las hembras (Mak, Enwere et al. 2007).

Se ha demostrado también que la interacción de ratonas machos con sus crías promueve la neurogénesis del BOP, mostrando un incremento en el porcentaje de células nuevas que expresaron el marcador NeuN. Aparentemente este cambio es mediado por la prolactina ya que cuando se interfiere en la vía de señalización de esta hormona ya no se observa este incremento. Además, las células nuevas que se incrementan en el bulbo olfatorio por el reconocimiento de las crías se activan (medido por el gen de expresión temprana *Egr1*) selectivamente ante una exposición posterior a estos mismos olores (Mak and Weiss 2010).

De acuerdo a nuestras observaciones y las de otros grupos es claro que las conductas reproductivas dependen de las claves olfatorias, y a su vez, las conductas reproductivas y las claves olfatorias involucradas pueden regular la formación, llegada, incorporación y supervivencia de las neuronas nuevas al bulbo olfatorio, y no de las células gliales que parecen no intervenir en estos procesos. La regulación de las conductas reproductivas por las claves olfatorias se hace aún más evidente cuando vemos que ratonas anósmicas, que, entre otras cosas, son incapaces de distinguir entre machos intactos de machos castrados, muestran ciclos hormonales anormales y una conducta sexual deficiente (Keller, Douhard et al. 2006; Keller, Douhard et al. 2006; Keller, Pierman et al. 2006).

Como lo hemos mencionado, las claves olfatorias son indispensables para el establecimiento de la conducta materna en ratonas y cabras, y esta conducta parece regular también el proceso de

formación de nuevas neuronas en el bulbo olfatorio (Shingo, Gregg et al. 2003; Brus, Meurisse et al. 2010). Las ovejas utilizan las claves olfatorias para reconocer y cuidar a sus propias crías (Yeh, Pu et al. 2008), mientras que en los ratones, las claves olfatorias les permiten reconocer crías y desencadenar el cuidado materno siempre mostrando una preferencia a las crías propias (Dewing, Boulware et al. 2007). Asimismo, en ratones, la interacción con las crías durante el periodo perinatal parece ser esencial para el reconocimiento de las crías y para la proliferación celular en la ZSV y formación de nuevas neuronas en el bulbo olfatorio (Mak and Weiss 2010).

Por otro lado, existe un trabajo reciente que demuestra que si previenen la neurogénesis del bulbo olfatorio, mediante la irradiación a la ZSV a ratonas hembras no se afecta la conducta materna y tampoco afecta la capacidad de las ratonas de reconocer a sus crías (Feierstein, Lazarini et al. 2010). Ellos sugieren que éste resultado pudiera deberse a que el cuidado maternal es también una conducta mediada por procesos de motivación, por lo que quizás, la disminución de la neurogénesis no afecte este tipo de procesos, y sí los que están únicamente relacionados con el procesamiento de olores. Además, dado que la irradiación que ellos utilizaron no eliminó por completo la neurogénesis del bulbo olfatorio, es posible que las neuronas nuevas que sobrevivieron a esta irradiación suplan la función de las otras y sea por esto que la conducta no se pierda.

Como vemos, nuestros resultados son consistentes con otros donde se demuestra que en general, los procesos relacionados con la reproducción, es decir, desde la selección de pareja, la cópula, la preñez y la lactancia están íntimamente involucrados en la regulación del proceso de neurogenesis del bulbo olfatorio. Es importante recordar que la diferenciación y determinación del linaje celular en el adulto ocurre durante los primeros 5 días de vida de las células (Petreanu and Alvarez-Buylla 2002; Ming and Song 2005), y por lo tanto, además de las conductas previamente descritas, existen varios factores que se han identificado hasta el momento que contribuyen también a la determinación del linaje neuronal de las células, como lo son la expresión de los factores Dlx1, Dlx2, Pax6, Sp8, Emx1, Er81, por mencionar algunos (Hack, Saghatelyan et al. 2005; Ming and Song 2005).

Así mismo, existe evidencia de que algunas conductas pudieran determinar cambios en el proceso de neurogénesis adulta mediante cambios en factores específicos, por ejemplo en la remodelación de la cromatina, mediante coactivadores transcripcionales, por ejemplo el consumo de drogas en roedores que genera alteraciones en la estructura de la cromatina, y a su vez cambios en la expresión de genes implicados en respuestas conductuales y plasticidad sináptica (Perry,

Paramadilok et al. 2009). Todo esto nos sugiere que aún hay mucho desconocimiento en este proceso, como para poder explicar cómo algunas conductas que son tan complejas pueden promover cambios tan específicos en el proceso de neurogénesis adulta.

Por otro lado, una vez que las células nuevas llegan al bulbo olfatorio, y han sobrevivido a su periodo crítico, se integran funcionalmente en los circuitos preexistentes, y son capaces de presentar actividad sináptica y respuestas eléctricas ante estimulación olfatoria (Saghatelian, Carleton et al. 2003; Magavi, Mitchell et al. 2005; Whitman and Greer 2009). Estas nuevas células, en particular, las células granulares que han sido las más estudiadas debido a su alta tasa de generación, muestran propiedades únicas comparadas con las células granulares preexistentes; tienen una alta plasticidad sináptica, y una respuesta mayor hacia los olores, es decir, son más sensibles ante los olores nuevos (Magavi, Mitchell et al. 2005; Nissant, Bardy et al. 2009).

Nuestros resultados muestran que las células nuevas que se encontraron en el bulbo olfatorio se activaron ante los diferentes estímulos. Sin embargo, en el BOP no se encontraron diferencias en este porcentaje de activación de las células nuevas ante los estímulos olfatorios, la conducta sexual y las hembras control, teniendo aproximadamente un 40% de activación en la capa granular y un 30% en la capa glomerular. En el BOA por otro lado, en la capa celular interna se observó que en las hembras que regularon la cópula antes de ser sacrificadas, un 65% de las células nuevas se activaron, lo cual fue significativamente mayor que el porcentaje de células nuevas que se activaron (35% aproximadamente) en las hembras que no fueron estimuladas previo su sacrificio. Este incremento en el porcentaje de células nuevas que se activaron en la capa celular interna como respuesta a la cópula regulada fue específicamente en las células nuevas situadas en la región anterior. En la capa glomerular también se observó un incremento en el porcentaje de las células nuevas que se activaron en las hembras que copularon pero sin regular los contactos (60%) comparado con las hembras controles (18%). Este incremento en el porcentaje de células nuevas que se activaron se observó en la región anterior de la capa glomerular tanto en las hembras que no regularon la cópula (54%), como las que la regularon (68%) comparado con las hembras control (12%). Estos resultados sugieren que las células nuevas que se encuentran en el BOA 45 después de su generación son capaces de activarse principalmente ante la conducta sexual y no ante estímulos olfatorios sexuales y no sexuales.

Las células nuevas que se incorporan al bulbo olfatorio parecen ser especialmente sensibles a los estímulos entre los 28 y los 56 días de nacidas dado que es en este periodo cuando la densidad de

espinas dendríticas se incrementa, lo que resulta en una producción exagerada de contactos sinápticos y por lo tanto una capacidad mayor de activación ante cualquier estímulo olfatorio (Sinchak, Dewing et al. 2007). Se podría pensar entonces que todas las células nuevas serían capaces de activarse ante los diferentes estímulos, sin embargo esto únicamente ocurrió en el BOP en donde observamos que la activación celular fue por igual para todas las hembras, ya que en el BOA las hembras que realizaron conducta sexual fueron las que mostraron un porcentaje mayor de activación de estas células nuevas. Esto puede deberse a la relación que hay entre la función del BOA y la conducta sexual.

En primer lugar, la conducta sexual femenina parece estar altamente regulada por el procesamiento de olores por el BOA. En hamsters sin experiencia sexual previa, la remoción del órgano vomeronasal, que constituye la entrada de información al BOA, causa deficiencias severas en la expresión de la conducta sexual, sin embargo, cuando los hamsters adquieren experiencia sexual, la ausencia del órgano vomeronasal no genera deficiencias graves en esta conducta, lo cual implica de manera importante al BOA en la expresión de la primera vez que los animales copulan (Maerkel, Durrer et al. 2007; Phillips-Farfan, Lemus et al. 2007). Así mismo, las lesiones en el órgano vomeronasal eliminan por completo la conducta receptiva de las hembras (medido por la expresión de lordosis) en hamsters, perros de la pradera, ratas y ratones (Guarraci and Clark 2006; Keller, Pierman et al. 2006; Kumar, Vetrivelan et al. 2006; Reznikov, Nosenko et al. 2006). En segundo lugar tenemos que el BOA recibe información directa de varias estructuras centrales como el núcleo lecho de la estría terminal, la porción rostral y medial de la amígdala medial, y la amígdala posteromedial (Keller, Baum et al. 2009).

La amígdala posteromedial y el núcleo lecho de la estría terminal son dos de las regiones que se activan (medido por la expresión de Fos) después de que las hembras reciben estimulación vaginocervical natural mediante conducta sexual o mediante manipulación artificial (Erskine 1993; Erskine, Lehmann et al. 2004; Hosokawa and Chiba 2005; Veening, Coolen et al. 2005; Dominguez, Gil et al. 2006). Esto implica la posibilidad de que las hembras que tuvieron conducta sexual, al recibir la estimulación por parte del macho se activaran éstas dos regiones. Como consecuencia de esta activación, la información que llega al BOA pudiera promover la activación de las células nuevas. Esta posibilidad hace sentido ya que las células que reciben directamente información de las fibras centrífugas son las interneuronas granulares, lo que activaría a su vez a las interneuronas glomerulares una vez que las células mitrales han sido activadas también. Por otro lado, las células periglomerulares, dado que también se activan ante la cópula, pudieran estar muy relacionadas con la

discriminación de pareja (del macho) que tiene que hacer la hembra cada vez que el macho se acerca, así como podrían estar activando para permitir la ejecución de la cópula.

El porcentaje más alto de células de la capa celular interna activadas (medido por Fos) fue tras la conducta sexual regulada, y la mayor activación de las células periglomerulares fue tras la conducta sexual regulada y no regulada, esto sugiere además, que la activación de las células nuevas por la conducta sexual es diferencial, así como los dos tipos de conducta sexual. Esto es muy interesante ya que la diferencia entre la cópula regulada y la cópula no regulada se basa en la cantidad de estimulación que la hembra recibe, así como la temporalidad de la misma. Esto implica que la activación de las estructuras que conectan al BOA puede ser diferencial, y por ende, activar distintamente a las células del BOA. Se ha demostrado que las hembras que reciben 15 intromisiones en cópula regulada comparado con 15 intromisiones en cópula no regulada incrementan la expresión de Fos en la amígdala posteromedial (Erskine and Hanrahan 1997), lo que indica que sí existe una activación diferencial en la amígdala por la cualidad de la estimulación, y probablemente esta activación diferencial sea la que esté generando la activación de las células granulares en el BOA.

Ahora bien, no podemos dejar a un lado el hecho de que la conducta sexual es una conducta motivada y que por lo tanto es capaz de generar estados afectivos positivos en las hembras. Nuestro grupo ha demostrado que en las hembras, la cópula regulada y no la cópula no regulada es capaz de generar un cambio de preferencia de lugar en las hembras (Paredes and Alonso 1997; Martinez and Paredes 2001; Corona, Camacho et al. 2011), debido al estado afectivo positivo producido por el tipo de estimulación vaginocervical que la hembra recibe mediante las intromisiones, que pueden ser 10 mínimo (Paredes and Alonso 1997) o las que se generen durante una hora de cópula (Arzate, Portillo et al. 2011). Recientemente se demostró que la estimulación del clítoris por sí sola es capaz de inducir un cambio de preferencia de lugar (Sinchak, Mills et al. 2004), esto indica que la estimulación vaginocervical que la hembra recibe durante la cópula regulada y/o la estimulación particular del clítoris son capaces de generar el estado afectivo positivo en las hembras.

El estado afectivo positivo que la cópula regulada genera parece no estar mediada por la dopamina, dado que la administración de antagonistas a dopamina no son capaces de bloquear el cambio de preferencia de lugar que se induce por la cópula regulada (García Horsman and Paredes 2004). En contraste, la administración de naloxona, un antagonista opioide sí bloquea el cambio de preferencia de lugar, sugiriendo que son los opioides los que están regulando el estado afectivo positivo que se genera en las hembras (García-Horsman, Agmo et al. 2008).

Los estímulos sexuales parecen ser determinantes para la neurogenesis y activación celular de la región anterior o rostral del BOA, ya que nuestros resultados muestran que el mayor porcentaje de neuronas nuevas, y de activación celular por la conducta sexual se localizaron específicamente en la región anterior. Estos resultados son consistentes con lo descrito previamente en donde se demostró en hembras, que las neuronas olfativas sensoriales localizadas en la región apical del órgano vomeronasal que están conectadas específicamente con la región anterior del BOA, se activan ante la orina de machos (Inamura, Matsumoto et al. 1999). Además, la exposición a la orina de macho induce la expresión de Fos principalmente en la región anterior del BOA (Inamura, Kashiwayanagi et al. 1999). De igual manera, cuando los machos son expuestos a orina de hembra en estro muestran una gran activación celular en la región anterior de la capa granular y de la capa glomerular del BOA (Honda, Sakamoto et al. 2008). Estos resultados indican que los olores sexualmente relevantes activan preferencialmente las células de la región anterior del BOA tanto en la capa granular como en la capa glomerular de las células que permanentemente se encuentran en el BOA.

De acuerdo a nuestros resultados, la exposición de hembras a los olores sexualmente relevantes que expiden los machos sexualmente expertos, no fue capaz de promover una mayor activación de las células nuevas, sin embargo, cuando expusimos a las hembras a machos sexualmente expertos y les permitimos que copularan, ya fuera en el paradigma de cópula regulada y cópula no regulada, se promovió la activación de las células nuevas localizadas en la región anterior del BOA. Esto podría sugerir que las células nuevas del BOA se activan más ante la conducta sexual que incluye olores sexualmente relevantes. Ahora, es importante mencionar que la información olfatoria de los machos al estar expuestos a una hembra es de características químicas diferentes a la información que se obtiene de la orina de los machos, ya que en el primer caso (nuestro caso), las moléculas de olor que las hembras pueden percibir son de tipo volátiles, ya que ellas nunca están en contacto directo con el macho, mientras que en el segundo caso, las hembras entran en contacto directo con las moléculas de olor presentes en la orina (no-volátiles). Esto último podría explicar las diferencias en la activación celular observada.

Nuestros resultados apoyan la idea de la relevancia funcional que tienen las células nuevas en las conductas involucradas con eventos reproductivos. Esta idea coincide con un trabajo reciente en el que demuestran en ratones hembra, que existe una relación directa entre la información que es procesada por el órgano vomeronasal y la neurogénesis específica del BOA. En este trabajo observaron que las nuevas neuronas que se adicionan al BOA constituyen el sustrato necesario para

la formación de la memoria que genera el olor de las feromonas de la pareja. Oboti y cols. (2003) demostraron con este trabajo la importancia funcional que tienen las células nuevas que se incorporan al BOA durante la vida adulta, debido a que son críticas para la mediación del procesamiento olfatorio, la formación de memorias de pareja y por lo tanto para la cópula (Kippin, Cain et al. 2003).

General

Finalmente, en estudios recientes se ha demostrado que las células nuevas del bulbo olfatorio parecen tener un papel importante en el aprendizaje y la memoria de información olfativa. La estimulación olfatoria, ya sea olores novedosos, o un paradigma de aprendizaje puede modificar la neurogénesis del bulbo olfatorio e incluso afectar conductas posteriores dependientes de olor, sin embargo las modificaciones que ocurren en la neurogénesis del bulbo olfatorio dependen de cómo se realice la estimulación olfatoria, cómo se manipule a los sujetos, de las tareas específicas que los sujetos tengan que realizar, etc., por lo que cada trabajo aporta un conocimiento particular de este proceso.

Sin embargo, se sabe que la crianza de un ratón en un ambiente enriquecido con respecto a los olores (no-sexualmente relevantes), es decir, un ambiente con olores novedosos en todo momento, genera el doble de neuronas nuevas que se incorporan al bulbo olfatorio, promoviendo también una memoria de olor de largo plazo (Rochefort, Gheusi et al. 2002). Por otro lado, ya se ha demostrado que al bloquear la neurogénesis del bulbo olfatorio se afecta la formación de memorias olfatorias a corto y largo plazo, pero la discriminación olfatoria parece no ser afectada, por lo que se sugiere que las nuevas neuronas pueden contribuir a los cambios en la representación de los olores durante un aprendizaje (Imayoshi, Sakamoto et al. 2008; Faass, Schlumpf et al. 2009; Paredes 2009; Sakuma 2009).

Existe evidencia que sugiere que los opioides pueden regular la neurogénesis adulta mediante la estimulación de sus receptores localizados en las células progenitoras y en las células nuevas (Persson, Thorlin et al. 2003; Narita, Kuzumaki et al. 2006; Harburg, Hall et al. 2007; Sargeant, Miller et al. 2008). La cópula regulada genera estados recompensantes (afectivos-positivos) (Paredes and Vazquez 1999; Martinez and Paredes 2001) aparentemente mediados por opioides endógenos, ya que la infusión de naloxona (antagonista de los receptores a opioides) previene el condicionamiento de preferencia de lugar que se genera como consecuencia del estado placentero (Martinez and

Paredes 2001; Garcia-Horsman, Agmo et al. 2008). A su vez, la cópula regulada puede ser asociada con un olor particular (estímulo olfatorio) y generar un condicionamiento olfatorio de preferencia de pareja (Coria-Avila, Ouimet et al. 2005; Coria-Avila, Gavrilá et al. 2008). Este condicionamiento de preferencia de pareja, que puede formarse con cualquier estímulo olfatorio asociado a la experiencia sexual recompensante (Coria-Avila, Solomon et al. 2008), también está mediado en gran medida por opioides. Para que las hembras puedan formar este condicionamiento se requiere de un entrenamiento de varias sesiones y por lo tanto necesitan copular repetidamente con un macho (Coria-Avila, Ouimet et al. 2005; Erskine 2005).

En nuestro trabajo, las hembras realizaron conducta sexual una única vez lo que les permitió generar estados recompensantes, pero no generar una memoria de dicho estímulo. Por lo tanto, este único y novedoso evento al que estuvieron sometidas las hembras promovió cambios muy específicos en el proceso de neurogénesis del bulbo olfatorio, y no podemos descartar entonces que estos cambios observados después de la conducta sexual (en particular de la cópula regulada) pudieran estar mediados por opioides. Por lo tanto, si el efecto recompensante de la cópula, a través de los opioides, estuviera promoviendo en gran medida los cambios observados en la neurogénesis del bulbo olfatorio, podríamos pensar que la cópula, como parte de las conductas reproductivas, promueve la mejora de la capacidad olfatoria que les permitirá a las hembras mejorar en su desempeño reproductivo posterior (elección de pareja, memoria de pareja, preñez y conducta materna). En particular, podríamos pensar, que el primer contacto sexual (en cópula regulada) de las hembras pudiera promover el sustrato neuroanatómico en el bulbo olfatorio accesorio necesario para los posteriores encuentros sexuales y facilitando así la formación de condicionamientos de preferencia de pareja que faciliten la reproducción.

En resumen, nuestros resultados nos permiten sugerir que un único encuentro sexual en la hembra es capaz de promover cambios en todo el proceso de neurogénesis del bulbo olfatorio. La cópula regulada incrementa la proliferación celular de nuevas células en la vía migratoria rostral, en particular en la región anterior. La cópula regulada tiene efectos también en la migración e incorporación celular al bulbo olfatorio accesorio. La cópula regulada no promueve la supervivencia celular del bulbo olfatorio, sin embargo, un único encuentro de cópula regulada promueve la definición del linaje neuronal de las nuevas células, por lo que, la cópula regulada incrementa el porcentaje de neuronas nuevas en el bulbo olfatorio accesorio, particularmente en la región anterior. Finalmente, las nuevas células localizadas en el bulbo olfatorio accesorio se activan preferencialmente ante la cópula regulada y no regulada. Estos resultados sugieren fuertemente que

estas células nuevas que se han incorporado al bulbo olfatorio tienen una relevancia funcional para la conducta sexual, sin embargo, se requiere de más experimentos que nos permitan conocer el papel específico de éstas nuevas células, así como los factores involucrados que promovieron estos cambios.

XI. CONCLUSIONES

La cópula regulada incrementa: la proliferación celular en la región anterior de la VMR, la llegada e incorporación celular al BOA y el porcentaje de neuronas nuevas en la región anterior de la capa celular interna del BOA. Así mismo, la cópula regulada incrementa la activación de las células nuevas localizadas en la región anterior de la capa celular interna, y en la región anterior de la capa glomerular del BOA. Por otro lado, las hembras que realizaron por primera vez cópula no regulada únicamente mostraron un incremento en la activación de sus células nuevas en la región anterior de la capa glomerular del BOA (ver Figura 40).

Estos resultados sugieren que la cópula regulada en la hembra es determinante para el proceso de neurogenesis adulta del bulbo olfatorio accesorio, y que las células nuevas que se incorporan al BOA son importantes en la conducta sexual femenina.

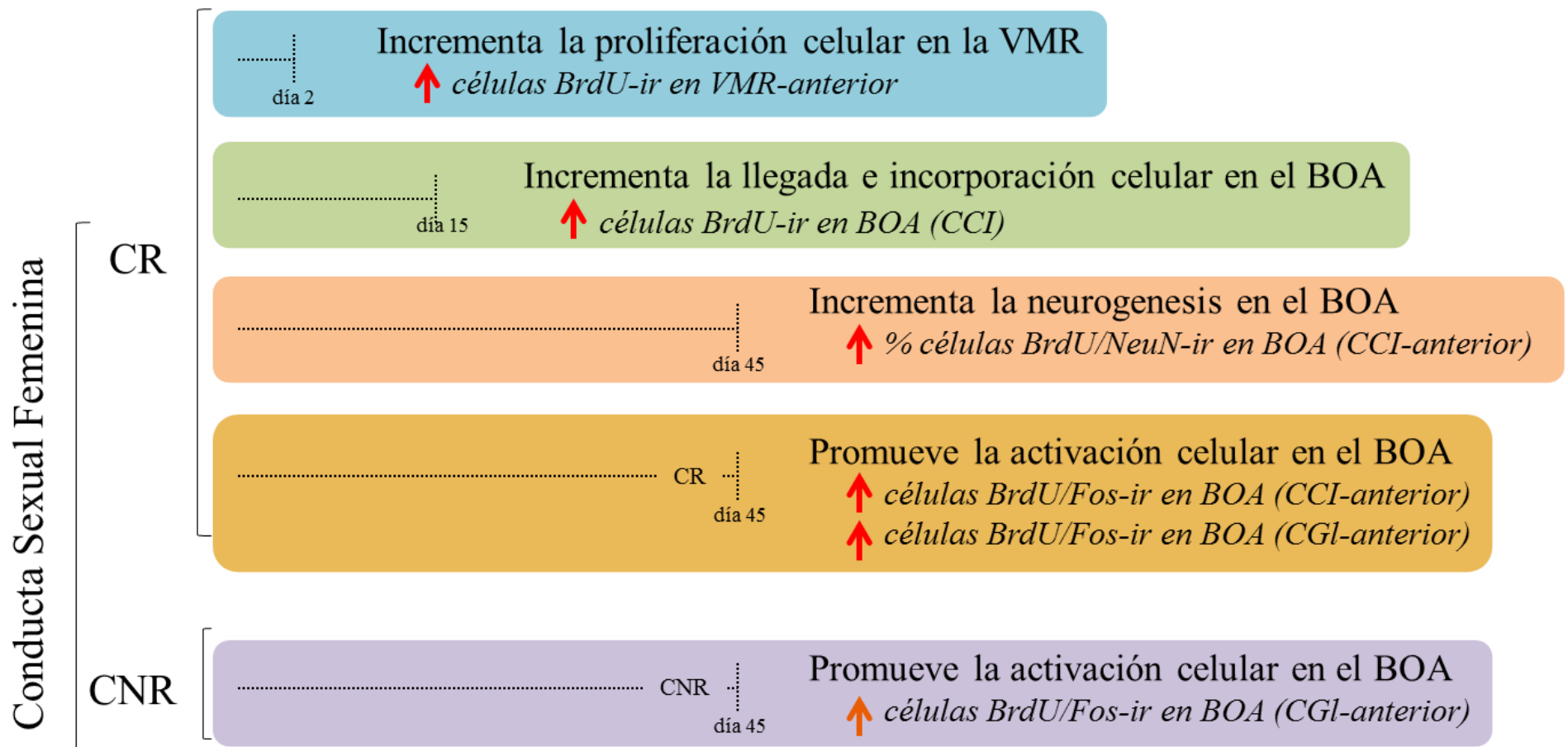


Figura 40. Efecto de la conducta sexual femenina sobre el proceso de neurogénesis adulta del bulbo olfatorio. El primer contacto sexual, regulado por la hembra (CR-cópula regulada) genera incrementos en las diferentes etapas del proceso: proliferación celular (en color azul), llegada e incorporación celular (en color verde), neurogénesis (en color naranja). Así mismo, la CR que realizaron las hembras 30 minutos previo al sacrificio activó a las células nuevas del bulbo olfatorio (en color amarillo). La cópula no regulada por la hembra (CNR) que realizaron las hembras antes del sacrificio (30 min antes) promovió la activación de las células nuevas del bulbo olfatorio (en color morado). VMR-vía migratoria rostral; BOA-bulbo olfatorio accesorio; CCI-capa celular interna; CGI-capa glomerular; BrdU-marcador mitótico; NeuN-proteína neuronal; Fos-indicador de activación celular.

XII. REFERENCIAS

- Abrous, D. N., M. Koehl, et al. (2005). "Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology." Physiol Rev **85**(2): 523-569.
- Agmo, A. (1999). "Sexual motivation--an inquiry into events determining the occurrence of sexual behavior." Behav Brain Res **105**(1): 129-150.
- Alonso, M., I. Ortega-Perez, et al. (2008). "Turning astrocytes from the rostral migratory stream into neurons: a role for the olfactory sensory organ." J Neurosci **28**(43): 11089-11102.
- Alonso, M., C. Viollet, et al. (2006). "Olfactory discrimination learning increases the survival of adult-born neurons in the olfactory bulb." J Neurosci **26**(41): 10508-10513.
- Altman, J. (1962). "Are new neurons formed in the brains of adult mammals?" Science **135**: 1127-1128.
- Altman, J. and G. D. Das (1965). "Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats." J Comp Neurol **124**(3): 319-335.
- Altman, J. and G. D. Das (1965). "Post-natal origin of microneurons in the rat brain." Nature **207**(5000): 953-956.
- Alvarez-Buylla, A. and J. M. Garcia-Verdugo (2002). "Neurogenesis in adult subventricular zone." J Neurosci **22**(3): 629-634.
- Arzate, D. M., W. Portillo, et al. "Extended paced mating tests induces conditioned place preference without affecting sexual arousal." Horm Behav.
- Arzate, D. M., W. Portillo, et al. (2011). "Extended paced mating tests induces conditioned place preference without affecting sexual arousal." Horm Behav **59**(5): 674-680.
- Au, W. W., H. B. Treloar, et al. (2002). "Sublaminar organization of the mouse olfactory bulb nerve layer." J Comp Neurol **446**(1): 68-80.
- Bardy, C., M. Alonso, et al. (2010). "How, When, and Where New Inhibitory Neurons Release Neurotransmitters in the Adult Olfactory Bulb." J. Neurosci. **30**(50): 17023-17034.
- Baum, M. J. and K. R. Kelliher (2009). "Complementary roles of the main and accessory olfactory systems in mammalian mate recognition." Annu Rev Physiol **71**: 141-160.
- Baum, M. J. and E. B. Keverne (2002). "Sex difference in attraction thresholds for volatile odors from male and estrous female mouse urine." Horm Behav **41**(2): 213-219.
- Beach, F. A. (1976). "Sexual attractivity, proceptivity, and receptivity in female mammals." Horm Behav **7**(1): 105-138.
- Belluzzi, O., M. Benedusi, et al. (2003). "Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb." J Neurosci **23**(32): 10411-10418.
- Bernier, P. J., A. Bedard, et al. (2002). "Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(17): 11464-11469.
- Bovetti, S., P. Peretto, et al. (2007). "Spatio-temporal specification of olfactory bulb interneurons." J Mol Histol **38**(6): 563-569.
- Brennan, P. A. "Pheromones and Mammalian Behavior."
- Brennan, P. A. and E. B. Keverne (2004). "Something in the air? New insights into mammalian pheromones." Curr Biol **14**(2): R81-89.
- Brennan, P. A. and F. Zufall (2006). "Pheromonal communication in vertebrates." Nature **444**(7117): 308-315.
- Brus, M., M. Meurisse, et al. (2010). "Evidence for cell proliferation in the sheep brain and its down-regulation by parturition and interactions with the young." Horm Behav **58**(5): 737-746.
- Buck, L. and R. Axel (1991). "A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition." Cell **65**(1): 175-187.

- Carleton, A., L. T. Petreanu, et al. (2003). "Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb." Nat Neurosci **6**(5): 507-518.
- Carleton, A., C. Rochefort, et al. (2002). "Making scents of olfactory neurogenesis." J Physiol Paris **96**(1-2): 115-122.
- Coria-Avila, G. A., A. M. Gavrilu, et al. (2008). "Neurochemical basis of conditioned partner preference in the female rat: II. Disruption by flupenthixol." Behav Neurosci **122**(2): 396-406.
- Coria-Avila, G. A., S. L. Jones, et al. (2006). "Conditioned partner preference in female rats for strain of male." Physiol Behav **88**(4-5): 529-537.
- Coria-Avila, G. A., A. J. Ouimet, et al. (2005). "Olfactory conditioned partner preference in the female rat." Behav Neurosci **119**(3): 716-725.
- Coria-Avila, G. A. and J. G. Pfaus (2007). "Neuronal activation by stimuli that predict sexual reward in female rats." Neuroscience **148**(3): 623-632.
- Coria-Avila, G. A., C. E. Solomon, et al. (2008). "Neurochemical basis of conditioned partner preference in the female rat: I. Disruption by naloxone." Behav Neurosci **122**(2): 385-395.
- Corona, R., F. J. Camacho, et al. (2011). "Different doses of estradiol benzoate induce conditioned place preference after paced mating." Horm Behav **60**(3): 264-268.
- Corona, R., J. Larriva-Sahd, et al. (2011). "Paced-mating increases the number of adult new born cells in the internal cellular (granular) layer of the accessory olfactory bulb." PLoS One **6**(5): e19380.
- Chojnacki, A. K., G. K. Mak, et al. (2009). "Identity crisis for adult periventricular neural stem cells: subventricular zone astrocytes, ependymal cells or both?" Nat Rev Neurosci **10**(2): 153-163.
- de la Rosa-Prieto, C., D. Saiz-Sanchez, et al. "Neurogenesis in subclasses of vomeronasal sensory neurons in adult mice." Dev Neurobiol **70**(14): 961-970.
- De La Rosa-Prieto, C., D. Saiz-Sanchez, et al. (2009). "Fate of marginal neuroblasts in the vomeronasal epithelium of adult mice." J Comp Neurol **517**(5): 723-736.
- Dewing, P., M. I. Boulware, et al. (2007). "Membrane estrogen receptor-alpha interactions with metabotropic glutamate receptor 1a modulate female sexual receptivity in rats." J Neurosci **27**(35): 9294-9300.
- Doetsch, F. and A. Alvarez-Buylla (1996). "Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(25): 14895-14900.
- Doetsch, F., I. Caille, et al. (1999). "Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain." Cell **97**(6): 703-716.
- Doetsch, F., J. M. Garcia-Verdugo, et al. (1997). "Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain." J Neurosci **17**(13): 5046-5061.
- Dominguez, J. M., M. Gil, et al. (2006). "Preoptic glutamate facilitates male sexual behavior." J Neurosci **26**(6): 1699-1703.
- Dorries, K. M., E. Adkins-Regan, et al. (1997). "Sensitivity and behavioral responses to the pheromone androstenone are not mediated by the vomeronasal organ in domestic pigs." Brain Behav Evol **49**(1): 53-62.
- Dudley, C. A. and R. L. Moss (1994). "Lesions of the accessory olfactory bulb decrease lordotic responsiveness and reduce mating-induced c-fos expression in the accessory olfactory system." Brain Res **642**(1-2): 29-37.
- Eriksson, P. S., E. Perfilieva, et al. (1998). "Neurogenesis in the adult human hippocampus." Nat Med **4**(11): 1313-1317.
- Erskine, M. S. (1989). "Solicitation behavior in the estrous female rat: a review." Horm Behav **23**(4): 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." Behav Neurosci **106**(4): 690-697.

- Erskine, M. S. (1993). "Mating-induced increases in FOS protein in preoptic area and medial amygdala of cycling female rats." Brain Res Bull **32**(5): 447-451.
- Erskine, M. S. (1995). "Prolactin release after mating and genitosensory stimulation in females." Endocr Rev **16**(4): 508-528.
- Erskine, M. S. (2005). "Learning about sex: conditioning of partner preference: theoretical comment on Coria-Avila et Al. (2005)." Behav Neurosci **119**(4): 1136-1139.
- Erskine, M. S. and S. B. Hanrahan (1997). "Effects of paced mating on c-fos gene expression in the female rat brain." J Neuroendocrinol **9**(12): 903-912.
- Erskine, M. S., M. L. Lehmann, et al. (2004). "Co-regulation of female sexual behavior and pregnancy induction: an exploratory synthesis." Behav Brain Res **153**(2): 295-315.
- Faass, O., M. Schlumpf, et al. (2009). "Female sexual behavior, estrous cycle and gene expression in sexually dimorphic brain regions after pre- and postnatal exposure to endocrine active UV filters." Neurotoxicology **30**(2): 249-260.
- Fan, S. and M. Luo (2009). "The organization of feedback projections in a pathway important for processing pheromonal signals." Neuroscience **161**(2): 489-500.
- Feierstein, C. E., F. Lazarini, et al. (2010). "Disruption of Adult Neurogenesis in the Olfactory Bulb Affects Social Interaction but not Maternal Behavior." Front Behav Neurosci **4**: 176.
- Fuchs, E., T. Tumber, et al. (2004). "Socializing with the neighbors: stem cells and their niche." Cell **116**(6): 769-778.
- Garcia-Horsman, S. P., A. Agmo, et al. (2008). "Infusions of naloxone into the medial preoptic area, ventromedial nucleus of the hypothalamus, and amygdala block conditioned place preference induced by paced mating behavior." Horm Behav **54**(5): 709-716.
- Garcia Horsman, P. and R. G. Paredes (2004). "Dopamine antagonists do not block conditioned place preference induced by paced mating behavior in female rats." Behav Neurosci **118**(2): 356-364.
- Gerecke, K. M., R. Kishore, et al. (2012). "Alterations of sex-typical microanatomy: prenatal stress modifies the structure of medial preoptic area neurons in rats." Dev Psychobiol **54**(1): 16-27.
- Giachino, C., S. De Marchis, et al. (2005). "cAMP response element-binding protein regulates differentiation and survival of newborn neurons in the olfactory bulb." J Neurosci **25**(44): 10105-10118.
- Gould, E. and C. G. Gross (2002). "Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems." J Neurosci **22**(3): 619-623.
- Gould, E., A. J. Reeves, et al. (1999). "Neurogenesis in the neocortex of adult primates." Science **286**(5439): 548-552.
- Gould, E., P. Tanapat, et al. (2000). "Regulation of hippocampal neurogenesis in adulthood." Biol Psychiatry **48**(8): 715-720.
- Graham, M. D. and J. G. Pfaus (2012). "Differential effects of dopamine antagonists infused to the medial preoptic area on the sexual behavior of female rats primed with estrogen and progesterone." Pharmacol Biochem Behav **102**(4): 532-539.
- Guarraci, F. A. and A. S. Clark (2006). "Ibotenic acid lesions of the medial preoptic area disrupt the expression of partner preference in sexually receptive female rats." Brain Res **1076**(1): 163-170.
- Guevara-Guzman, R., B. Barrera-Mera, et al. (1997). "Effect of the estrous cycle on olfactory bulb response to vaginocervical stimulation in the rat: results from electrophysiology and Fos immunocytochemistry experiments." Brain Res Bull **44**(2): 141-149.
- Hack, M. A., A. Saghatelian, et al. (2005). "Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis." Nat Neurosci **8**(7): 865-872.
- Harburg, G. C., F. S. Hall, et al. (2007). "Knockout of the mu opioid receptor enhances the survival of adult-generated hippocampal granule cell neurons." Neuroscience **144**(1): 77-87.

- Hardy, D. F. and J. F. Debold (1971). "Effects of mounts without intromission upon the behavior of female rats during the onset of estrogen-induced heat." Physiol Behav **7**(4): 643-645.
- Hardy, D. F. and J. F. DeBold (1972). "Effects of coital stimulation upon behavior of the female rat." J Comp Physiol Psychol **78**(3): 400-408.
- Herrera, D. G., J. M. Garcia-Verdugo, et al. (1999). "Adult-derived neural precursors transplanted into multiple regions in the adult brain." Ann Neurol **46**(6): 867-877.
- Honda, N., H. Sakamoto, et al. (2008). "Changes in Fos expression in the accessory olfactory bulb of sexually experienced male rats after exposure to female urinary pheromones." Eur J Neurosci **27**(8): 1980-1988.
- Hosokawa, N. and A. Chiba (2005). "Effects of sexual experience on conspecific odor preference and estrous odor-induced activation of the vomeronasal projection pathway and the nucleus accumbens in male rats." Brain Res **1066**(1-2): 101-108.
- Huang, L. and E. L. Bittman (2002). "Olfactory bulb cells generated in adult male golden hamsters are specifically activated by exposure to estrous females." Horm Behav **41**(3): 343-350.
- Hurtazo, H. A. and R. G. Paredes (2005). "Olfactory preference and Fos expression in the accessory olfactory system of male rats with bilateral lesions of the medial preoptic area/anterior hypothalamus." Neuroscience **135**(4): 1035-1044.
- Imayoshi, I., M. Sakamoto, et al. (2008). "Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain." Nat Neurosci **11**(10): 1153-1161.
- Inamura, K., M. Kashiwayanagi, et al. (1999). "Regionalization of Fos immunostaining in rat accessory olfactory bulb when the vomeronasal organ was exposed to urine." Eur J Neurosci **11**(7): 2254-2260.
- Inamura, K., Y. Matsumoto, et al. (1999). "Laminar distribution of pheromone-receptive neurons in rat vomeronasal epithelium." J Physiol **517** (Pt 3): 731-739.
- Jenkins, W. J., J. B. Becker, et al. (2005). "Sex in The behavior of the laboratory rat." Oxford.
- Kang, N., M. J. Baum, et al. (2009). "A direct main olfactory bulb projection to the 'vomeronasal' amygdala in female mice selectively responds to volatile pheromones from males." Eur J Neurosci **29**(3): 624-634.
- Karlson, P. and M. Luscher (1959). "Pheromones': a new term for a class of biologically active substances." Nature **183**(4653): 55-56.
- Kee, N., S. Sivalingam, et al. (2002). "The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis." J Neurosci Methods **115**(1): 97-105.
- Keller, M. and J. Bakker (2009). "Pheromonal communication in higher vertebrates and its implication on reproductive function. Editorial." Behav Brain Res **200**(2): 237-238.
- Keller, M., M. J. Baum, et al. (2009). "The main and the accessory olfactory systems interact in the control of mate recognition and sexual behavior." Behav Brain Res **200**(2): 268-276.
- Keller, M., Q. Douhard, et al. (2006). "Destruction of the main olfactory epithelium reduces female sexual behavior and olfactory investigation in female mice." Chem Senses **31**(4): 315-323.
- Keller, M., Q. Douhard, et al. (2006). "Sexual experience does not compensate for the disruptive effects of zinc sulfate--lesioning of the main olfactory epithelium on sexual behavior in male mice." Chem Senses **31**(8): 753-762.
- Keller, M., S. Pierman, et al. (2006). "The vomeronasal organ is required for the expression of lordosis behaviour, but not sex discrimination in female mice." Eur J Neurosci **23**(2): 521-530.
- Kelliher, K. R. and S. R. Wersinger (2009). "Olfactory regulation of the sexual behavior and reproductive physiology of the laboratory mouse: effects and neural mechanisms." ILAR J **50**(1): 28-42.
- Kimchi, T., J. Xu, et al. (2007). "A functional circuit underlying male sexual behaviour in the female mouse brain." Nature **448**(7157): 1009-1014.

- Kippin, T. E., S. W. Cain, et al. (2003). "Estrous odors and sexually conditioned neutral odors activate separate neural pathways in the male rat." Neuroscience **117**(4): 971-979.
- Kiselyov, K., D. B. van Rossum, et al. "TRPC channels in pheromone sensing." Vitam Horm **83**: 197-213.
- Kleitz-Nelson, H. K., J. M. Dominguez, et al. (2010). "Is sexual motivational state linked to dopamine release in the medial preoptic area?" Behav Neurosci **124**(2): 300-304.
- Kornack, D. R. and P. Rakic (2001). "Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex." Science **294**(5549): 2127-2130.
- Kosaka, K. and T. Kosaka (2005). "synaptic organization of the glomerulus in the main olfactory bulb: compartments of the glomerulus and heterogeneity of the periglomerular cells." Anat Sci Int **80**(2): 80-90.
- Kumar, V. M., R. Vetrivelan, et al. (2006). "Alpha-1 adrenergic receptors in the medial preoptic area are involved in the induction of sleep." Neurochem Res **31**(8): 1095-1102.
- Larriva-Sahd, J. (2008). "The accessory olfactory bulb in the adult rat: a cytological study of its cell types, neuropil, neuronal modules, and interactions with the main olfactory system." J Comp Neurol **510**(3): 309-350.
- Leon, M. and B. A. Johnson (2003). "Olfactory coding in the mammalian olfactory bulb." Brain Res Brain Res Rev **42**(1): 23-32.
- Leung, C. T., P. A. Coulombe, et al. (2007). "Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration." Nat Neurosci **10**(6): 720-726.
- Levy, F. and M. Keller (2009). "Olfactory mediation of maternal behavior in selected mammalian species." Behav Brain Res **200**(2): 336-345.
- Leybold, B. G., C. R. Yu, et al. (2002). "Altered sexual and social behaviors in trp2 mutant mice." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(9): 6376-6381.
- Lie, D. C., H. Song, et al. (2004). "Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases." Annu Rev Pharmacol Toxicol **44**: 399-421.
- Lim, D. A. and A. Alvarez-Buylla (1999). "Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(13): 7526-7531.
- Liman, E. R., D. P. Corey, et al. (1999). "TRP2: a candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(10): 5791-5796.
- Lin, H. L., R. D. Restrepo, et al. (2007). "Effect of face mask design on inhaled mass of nebulized albuterol, using a pediatric breathing model." Respir Care **52**(8): 1021-1026.
- Liu, W. L. and M. T. Shipley (1994). "Intrabulbar associational system in the rat olfactory bulb comprises cholecystinin-containing tufted cells that synapse onto the dendrites of GABAergic granule cells." J Comp Neurol **346**(4): 541-558.
- Lois, C. and A. Alvarez-Buylla (1993). "Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(5): 2074-2077.
- Lois, C. and A. Alvarez-Buylla (1994). "Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain." Science **264**(5162): 1145-1148.
- Lois, C., J. M. Garcia-Verdugo, et al. (1996). "Chain migration of neuronal precursors." Science **271**(5251): 978-981.
- Lledo, P. M. (2008). "Adult Neurogenesis in the Olfactory Bulb in Adult Neurogenesis." Cold Spring Harbor Laboratory Press: 425-443.
- Lledo, P. M., M. Alonso, et al. (2006). "Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits." Nat Rev Neurosci **7**(3): 179-193.
- Lledo, P. M. and G. Gheusi (2003). "Olfactory processing in a changing brain." Neuroreport **14**(13): 1655-1663.
- Lledo, P. M. and F. Lazarini (2007). "Neuronal replacement in microcircuits of the adult olfactory system." C R Biol **330**(6-7): 510-520.

- Maerkel, K., S. Durrer, et al. (2007). "Sexually dimorphic gene regulation in brain as a target for endocrine disrupters: developmental exposure of rats to 4-methylbenzylidene camphor." Toxicol Appl Pharmacol **218**(2): 152-165.
- Magavi, S. S., B. D. Mitchell, et al. (2005). "Adult-born and preexisting olfactory granule neurons undergo distinct experience-dependent modifications of their olfactory responses in vivo." J Neurosci **25**(46): 10729-10739.
- Mak, G. K., E. K. Enwere, et al. (2007). "Male pheromone-stimulated neurogenesis in the adult female brain: possible role in mating behavior." Nat Neurosci **10**(8): 1003-1011.
- Mak, G. K. and S. Weiss (2010). "Paternal recognition of adult offspring mediated by newly generated CNS neurons." Nat Neurosci **13**(6): 753-758.
- Mandairon, N., F. Jourdan, et al. (2003). "Deprivation of sensory inputs to the olfactory bulb up-regulates cell death and proliferation in the subventricular zone of adult mice." Neuroscience **119**(2): 507-516.
- Martinez-Marcos, A. (2009). "On the organization of olfactory and vomeronasal cortices." Prog Neurobiol **87**(1): 21-30.
- Martinez-Marcos, A. and M. Halpern (1999). "Differential projections from the anterior and posterior divisions of the accessory olfactory bulb to the medial amygdala in the opossum, *Monodelphis domestica*." Eur J Neurosci **11**(11): 3789-3799.
- Martinez-Ricos, J., C. Agustin-Pavon, et al. (2008). "Role of the vomeronasal system in intersexual attraction in female mice." Neuroscience **153**(2): 383-395.
- Martinez, I. and R. G. Paredes (2001). "Only self-paced mating is rewarding in rats of both sexes." Horm Behav **40**(4): 510-517.
- McClintock, M. K. and N. T. Adler (1978). *The Role of the Female During Copulation in Wild and Domestic Norway Rats (Rattus Norvegicus)*. P. C. H. Albers and B. D. Wisenden. Leiden, The Netherlands, BRILL. **67**: 67-95.
- McClintock, M. K. and J. J. Anisko (1982). "Group mating among Norway rats I. Sex differences in the pattern and neuroendocrine consequences of copulation." Animal Behaviour **30**(2): 398-409.
- McClintock, M. K., J. J. Anisko, et al. (1982). "Group mating among Norway rats II. The social dynamics of copulation: Competition, cooperation, and mate choice." Animal Behaviour **30**(2): 410-425.
- Meerts, S. H., F. A. Guarraci, et al. (2012). "An intact medial preoptic area is necessary for zaprinast to modulate paced mating behavior in female rats." Physiol Behav **105**(2): 264-268.
- Merkle, F. T., Z. Mirzadeh, et al. (2007). "Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain." Science **317**(5836): 381-384.
- Ming, G. L. and H. Song "Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions." Neuron **70**(4): 687-702.
- Ming, G. L. and H. Song (2005). "Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system." Annu Rev Neurosci **28**: 223-250.
- Mombaerts, P. (1997). "Introduction: development of the olfactory system." Semin Cell Dev Biol **8**(2): 151-152.
- Mombaerts, P. (2004). "Odorant receptor gene choice in olfactory sensory neurons: the one receptor-one neuron hypothesis revisited." Curr Opin Neurobiol **14**(1): 31-36.
- Mori, K., H. Nagao, et al. (1999). "The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information." Science **286**(5440): 711-715.
- Moyse, E., S. Bauer, et al. (2006). "Neurogenesis and neural stem cells in the dorsal vagal complex of adult rat brain: new vistas about autonomic regulations--a review." Auton Neurosci **126-127**: 50-58.
- Narita, M., N. Kuzumaki, et al. (2006). "Role of delta-opioid receptor function in neurogenesis and neuroprotection." J Neurochem **97**(5): 1494-1505.

- Nguyen-Ba-Charvet, K. T., N. Picard-Riera, et al. (2004). "Multiple roles for slits in the control of cell migration in the rostral migratory stream." *J Neurosci* **24**(6): 1497-1506.
- Nissant, A., C. Bardy, et al. (2009). "Adult neurogenesis promotes synaptic plasticity in the olfactory bulb." *Nat Neurosci* **12**(6): 728-730.
- Nottebohm, F. (1989). "From bird song to neurogenesis." *Sci Am* **260**(2): 74-79.
- Nottebohm, F. (2002). "Neuronal replacement in adult brain." *Brain Res Bull* **57**(6): 737-749.
- Orona, E., E. C. Rainer, et al. (1984). "Dendritic and axonal organization of mitral and tufted cells in the rat olfactory bulb." *J Comp Neurol* **226**(3): 346-356.
- Pankevich, D. E., B. R. Mueller, et al. (2009). "Prenatal stress programming of offspring feeding behavior and energy balance begins early in pregnancy." *Physiol Behav* **98**(1-2): 94-102.
- Paredes-Ramos, P., M. Miquel, et al. (2012). "Tickling in juvenile but not adult female rats conditions sexual partner preference." *Physiol Behav* **107**(1): 17-25.
- Paredes, R. G. (2008). "Evaluating the neurobiology of sexual reward." *Ilar J* **50**(1): 15-27.
- Paredes, R. G. (2009). "Evaluating the neurobiology of sexual reward." *ILAR J* **50**(1): 15-27.
- Paredes, R. G. and A. Alonso (1997). "Sexual behavior regulated (paced) by the female induces conditioned place preference." *Behav Neurosci* **111**(1): 123-128.
- Paredes, R. G. and I. Martinez (2001). "Naloxone blocks place preference conditioning after paced mating in female rats." *Behav Neurosci* **115**(6): 1363-1367.
- Paredes, R. G. and B. Vazquez (1999). "What do female rats like about sex? Paced mating." *Behav Brain Res* **105**(1): 117-127.
- Peretto, P., A. Merighi, et al. (1999). "The subependymal layer in rodents: a site of structural plasticity and cell migration in the adult mammalian brain." *Brain Res Bull* **49**(4): 221-243.
- Perry, A. N., A. Paramadilok, et al. (2009). "Neonatal oxytocin alters subsequent estrogen receptor alpha protein expression and estrogen sensitivity in the female rat." *Behav Brain Res* **205**(1): 154-161.
- Persson, A. I., T. Thorlin, et al. (2003). "Mu- and delta-opioid receptor antagonists decrease proliferation and increase neurogenesis in cultures of rat adult hippocampal progenitors." *Eur J Neurosci* **17**(6): 1159-1172.
- Petreanu, L. and A. Alvarez-Buylla (2002). "Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction." *J Neurosci* **22**(14): 6106-6113.
- Petrulis, A. and R. E. Johnston (1999). "Lesions centered on the medial amygdala impair scent-marking and sex-odor recognition but spare discrimination of individual odors in female golden hamsters." *Behav Neurosci* **113**(2): 345-357.
- Petrulis, A., M. Peng, et al. (1999). "Effects of vomeronasal organ removal on individual odor discrimination, sex-odor preference, and scent marking by female hamsters." *Physiol Behav* **66**(1): 73-83.
- Pfaff, D. W. and C. Pfaffmann (1969). "Olfactory and hormonal influences on the basal forebrain of the male rat." *Brain Res* **15**(1): 137-156.
- Phillips-Farfan, B. V., A. E. Lemus, et al. (2007). "Increased estrogen receptor alpha immunoreactivity in the forebrain of sexually satiated rats." *Horm Behav* **51**(3): 328-334.
- Pignatelli, A. and O. Belluzzi (2010). "Neurogenesis in the Adult Olfactory Bulb."
- Portillo, W. and R. G. Paredes (2004). "Sexual incentive motivation, olfactory preference, and activation of the vomeronasal projection pathway by sexually relevant cues in non-copulating and naive male rats." *Horm Behav* **46**(3): 330-340.
- Portillo, W., N. Unda, et al. (2012). "Sexual activity increases the number of newborn cells in the accessory olfactory bulb of male rats." *Front Neuroanat* **6**: 25.
- Rajendren, G., C. A. Dudley, et al. (1993). "Influence of male rats on the luteinizing hormone-releasing hormone neuronal system in female rats: role of the vomeronasal organ." *Neuroendocrinology* **57**(5): 898-906.

- Restrepo, D., J. Arellano, et al. (2004). "Emerging views on the distinct but related roles of the main and accessory olfactory systems in responsiveness to chemosensory signals in mice." Horm Behav **46**(3): 247-256.
- Reznikov, A. G., N. D. Nosenko, et al. (2006). "[Sex characteristics of neuroendocrine effects of prenatal exposure to exogenous glucocorticoids]." Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova **92**(2): 238-248.
- Rochefort, C., G. Gheusi, et al. (2002). "Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory." J Neurosci **22**(7): 2679-2689.
- Saghatelian, A., A. Carleton, et al. (2003). "Local neurons play key roles in the mammalian olfactory bulb." J Physiol Paris **97**(4-6): 517-528.
- Sakuma, Y. (2009). "Gonadal steroid action and brain sex differentiation in the rat." J Neuroendocrinol **21**(4): 410-414.
- Salazar, I. and P. A. Brennan (2001). "Retrograde labelling of mitral/tufted cells in the mouse accessory olfactory bulb following local injections of the lipophilic tracer DiI into the vomeronasal amygdala." Brain Res **896**(1-2): 198-203.
- Sargeant, T. J., J. H. Miller, et al. (2008). "Opioidergic regulation of astroglial/neuronal proliferation: where are we now?" J Neurochem **107**(4): 883-897.
- Scalia, F. and S. S. Winans (1975). "The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals." J Comp Neurol **161**(1): 31-55.
- Scott, J. W., D. P. Wellis, et al. (1993). "Functional organization of the main olfactory bulb." Microsc Res Tech **24**(2): 142-156.
- Seidenfaden, R., A. Desoeuvre, et al. (2006). "Glial conversion of SVZ-derived committed neuronal precursors after ectopic grafting into the adult brain." Mol Cell Neurosci **32**(1-2): 187-198.
- Shapiro, L. A., K. Ng, et al. (2009). "Subventricular zone-derived, newly generated neurons populate several olfactory and limbic forebrain regions." Epilepsy Behav **14 Suppl 1**: 74-80.
- Shepherd, G. M., W. R. Chen, et al. (2007). "The olfactory granule cell: from classical enigma to central role in olfactory processing." Brain Res Rev **55**(2): 373-382.
- Shingo, T., C. Gregg, et al. (2003). "Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin." Science **299**(5603): 117-120.
- Shipley, M. T., J. H. McLean, et al. (1995). "Olfactory System." in The Rat Nervous System: 899-926.
- Sinchak, K., P. Dewing, et al. (2007). "Release of orphanin FQ/nociceptin in the medial preoptic nucleus and ventromedial nucleus of the hypothalamus facilitates lordosis." Horm Behav **51**(3): 406-412.
- Sinchak, K., R. H. Mills, et al. (2004). "Medial preoptic area delta-opioid receptors inhibit lordosis." Behav Brain Res **155**(2): 301-306.
- Smith, M. T., V. Pencea, et al. (2001). "Increased number of BrdU-labeled neurons in the rostral migratory stream of the estrous prairie vole." Horm Behav **39**(1): 11-21.
- Snapyan, M., M. Lemasson, et al. (2009). "Vasculature guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via brain-derived neurotrophic factor signaling." J Neurosci **29**(13): 4172-4188.
- Stowers, L., T. E. Holy, et al. (2002). "Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2." Science **295**(5559): 1493-1500.
- Tanapat, P., L. A. Galea, et al. (1998). "Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus." Int J Dev Neurosci **16**(3-4): 235-239.
- Taupin, P. (2006). "Adult neurogenesis and neuroplasticity." Restor Neurol Neurosci **24**(1): 9-15.
- Taupin, P. (2006). "Adult neurogenesis in mammals." Curr Opin Mol Ther **8**(4): 345-351.
- Taupin, P. (2006). "Neural progenitor and stem cells in the adult central nervous system." Ann Acad Med Singapore **35**(11): 814-820.

- Taupin, P. (2007). "BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation." Brain Res Rev **53**(1): 198-214.
- Thompson, J. A., E. Salcedo, et al. (2012). "Second-order input to the medial amygdala from olfactory sensory neurons expressing the transduction channel TRPM5." J Comp Neurol **520**(8): 1819-1830.
- Vandenbergh, J. G. (1969). "Male odor accelerates female sexual maturation in mice." Endocrinology **84**(3): 658-660.
- Veening, J. G., L. M. Coolen, et al. (2005). "Do similar neural systems subserve aggressive and sexual behaviour in male rats? Insights from c-Fos and pharmacological studies." Eur J Pharmacol **526**(1-3): 226-239.
- Wachowiak, M. and M. T. Shipley (2006). "Coding and synaptic processing of sensory information in the glomerular layer of the olfactory bulb." Semin Cell Dev Biol **17**(4): 411-423.
- Watt, F. M. and B. L. Hogan (2000). "Out of Eden: stem cells and their niches." Science **287**(5457): 1427-1430.
- Whitman, M. C. and C. A. Greer (2009). "Adult neurogenesis and the olfactory system." Prog Neurobiol **89**(2): 162-175.
- Whitman, M. C. and C. A. Greer (2009). "Adult neurogenesis and the olfactory system." Prog Neurobiol.
- Winans, S. S. and F. Scalia (1970). "Amygdaloid nucleus: new afferent input from the vomeronasal organ." Science **170**(3955): 330-332.
- Winner, B., C. M. Cooper-Kuhn, et al. (2002). "Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb." Eur J Neurosci **16**(9): 1681-1689.
- Yamaguchi, M. and K. Mori (2005). "Critical period for sensory experience-dependent survival of newly generated granule cells in the adult mouse olfactory bulb." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(27): 9697-9702.
- Yeh, K. Y., H. F. Pu, et al. (2008). "Ginkgo biloba extract enhances male copulatory behavior and reduces serum prolactin levels in rats." Horm Behav **53**(1): 225-231.
- Young, K. M., T. D. Merson, et al. (2007). "p75 neurotrophin receptor expression defines a population of BDNF-responsive neurogenic precursor cells." J Neurosci **27**(19): 5146-5155.