



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

Instituto de Neurobiología

PAPEL DEL ÁREA PREÓPTICA MEDIAL EN LA PERCEPCIÓN Y
DISCRMINICACION DE ESTIMULOS OLFATORIOS SEXUALMENTE
RELEVANTES EN LA RATA MACHO.

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA
EL BIOL. JUAN PABLO MAC GREGOR

DIRECTOR DE TESIS
DR. RAÚL G PAREDES GUERRERO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA CAMPUS JURQUILLA UNAM

Campus Juriquilla, Querétaro. Enero 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A todos los integrantes del laboratorio que me ayudaron a hacer este trabajo con su ayuda, paciencia e instrucciones, este trabajo lleva mi nombre pero es de todos ellos. Al Dr. Raúl Paredes por la oportunidad y la paciencia. A Francisco por estar siempre ayudando con el trabajo en el laboratorio. A Arturo y Jose Carmen por sus ideas y sus discusiones interminables sobre el sistema olfatorio. A Wendy, Rebe, Gina, Lucy, Patricia por su ayuda por la motivación y por no haberme aventado por la ventana. A Doña Cipri por las comidas y por mantener la cosa en orden.

A mi familia, a toda por enseñarme a crecer y a ser, por sus ejemplos de amor y comunión, de ayuda y aliento, de alegría y por darme la sensación de plenitud. A mi esposa Adriana por soportarme con amor y cariño, por darme un motivo para hacerlo. A mi padre José Antonio por el apoyo por la sustancia y por los enojos que hicieron posible estas líneas finales. A mi madre Cecilia por haber cimentado las bases. A Enrique y Alejandra por la adopción completa. A mis hermanos Alejandra, Santiago, María y Sebastián por las risas y las esperanzas. A mis hermanos, los arquís, e Itzel que discuten conmigo desde la prepa y siguen haciéndolo. A mis hermanos morelianos: Asdrubal, Yuri y Misael y familia que los acompañan por aceptarme en la suya y formar parte de la mía. A mis pavos queridos: Berta, Jimes, Miris, Eva, Rebe, Claudia, Fer, Jeans, Juan Carlos, Ricardo y al mismísimo tocayo, a ellos les debo los últimos años de formación.

A mis compañeros de trabajo de ahora y antes, a los eriksonianos, a los politécnicos y a los lobos que me apoyaron en todo momento y sin dudar en la persecución de este evento y en mi crecimiento académico.

DEDICATORIA

A mi mamajita adorada, por la luz que dejó en mi y en el mundo.

Agradecimientos a:
Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
Becario N0 169764

Resumen

Se ha demostrado que la información olfatoria en la mayoría de las especies de vertebrados es importante para comunicar el sexo, la edad, el estado hormonal, entre otras cosas a sus conespecíficos. Las lesiones en diversas estructuras de la vía olfatoria afectan de diferente manera el desempeño de los machos en la conducta sexual. La lesión en el área preóptica medial del hipotálamo anterior (APM/HA) produce la inhibición permanente de la cópula en los machos de todas las especies hasta hoy estudiadas. Se ha propuesto que el APM/HA se encarga de discriminar los olores sexualmente relevantes y que la lesión bilateral de esta región impide el reconocimiento de hembras sexualmente receptivas.

En el presente trabajo evaluamos la posible participación del sistema olfatorio principal en la percepción de señales quimiosensoriales sexualmente relevantes y si el APM procesa este tipo de información. Los resultados demostraron que los machos intactos pueden reconocer señales sexualmente relevantes de índole volátil de la orina de sus conespecíficos. Esto se determinó utilizando una prueba de discriminación olfatoria de habituación deshabituación. La lesión bilateral del APM/HA en los machos interfirió con la discriminación de los olores de sus conespecíficos, pero no alteró la discriminación de olores no sexualmente relevantes. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el APM es una estructura involucrada en la discriminación de olores sexualmente relevantes en las ratas macho.

Abstract

It has been demonstrated that olfactory information is an important element to communicate sex, age, hormonal status, amongst other aspects, to their conspecifics. Olfaction is also important for a proper development of sexual behavior. Lesions of different structures of the olfactory pathway temporarily affect the expression of male sexual behavior. The medial preoptic area of the anterior hypothalamus (MPOA/AH) is an important structure of the olfactory system. The bilateral lesion of the MPOA/AH produces a permanent inhibition of sexual behavior in males of all the species studied to date. It has been suggested that this brain region is important in the processing of sexually relevant olfactory cues.

The aim of the present study was to determine the possible role of the main olfactory system (MOS) in the perception of olfactory signals, as well as to explore the role of the MPOA/AH in the processing of sexually relevant olfactory cues. The results indicate that males are able to recognize volatile sexually relevant olfactory cues from their conspecifics. This was determined using an olfactory discriminating test. The bilateral lesion of the MPOA/AH eliminates the male's ability to discriminate odors from conspecifics but not control odors. Together, these results suggests that the MPOA/AH is a very specialized structure involved in discriminating sexually relevant olfactory cues.

1. Introducción.....	9
2. Señales Olfatorias Sexualmente Relevantes	11
3. Experiencia sexual	13
4. Sistema Olfatorio Accesorio	14
4.1 Órgano Vomeronasal (OVN).....	15
4.2 Bulbo Olfatorio Accesorio.....	16
4.3 Amígdala (AMG)	17
4.4 Núcleo del lecho de la estría terminal (NLET).....	18
4.5 Área preóptica medial (APM/HA)	18
5. Sistema Olfatorio Principal (SOP).....	19
6. Conducta Sexual.....	24
7. APM/HA y Conducta Sexual	27
8 Hipótesis	30
9 Objetivos	30
10 Método General.	31
10.1 Animales	31
10.2 Grupos	31
10.3 Cirugía.....	32
10.4 Inmunohistoquímica	33
10.5 Conducta Sexual	31
10.6 Estímulos Olfatorios	32
11 Experimento 1. Prueba de Percepción Olfatoria	33
11.1 Antecedentes.....	33
11.2 Sujetos	34
11.3 Procedimiento	34
11.4 Prueba Olfatoria.....	35
11.5 Estadística.....	35
11.6 Resultados	37
11.6.1 Prueba 1	37
11.6.2 Prueba 2	38
11.6.3 Prueba 3.	40
11.7 Discusión.....	42
12. Experimento 2. Prueba de Discriminación de Olores Sexualmente Relevantes	43
12.1 Antecedentes.....	43
12.2 Sujetos	44
12.3 Procedimiento	44
12.4 Resultados	45
12.4.1 Prueba 5	45
12.4.2 Prueba 6	47
12.4.3 Prueba 7.	48
12.5 Discusión.....	50
13. Experimento 2.B.	51

13.1	Sujetos	51
13.2	Cirugía.....	51
13.3	Procedimiento	51
13.4	Histología	51
13.5	Estadística.....	52
13.6	Resultados	53
13.6.1	Prueba 8:	53
13.6.2	Prueba 9	54
13.6.3	Prueba 10.	57
13.7	Discusión.....	59
14.	Experimento 3. Motivación sexual incentiva.....	61
14.1	Sujetos	61
14.2	Procedimiento	61
14.3	Resultados	63
14.3.1	Prueba 11	63
14.3.2	Prueba 12:	64
14.4	Discusión.....	65
15.	Experimento 3.B	66
15.1	Prueba 13:	67
15.2	Prueba 14:	69
15.3	Discusión.....	71
16.	Discusión General	72
17.	Bibliografía	75

CAPÍTULO I.

“Bartleboom tiene treinta y ocho años. Él cree que en alguna parte, por el mundo, encontrará algún día a una mujer que, desde siempre, es su mujer. De vez en cuando lamenta que el destino se obstine en hacerle esperar con obstinación tan descortés, pero con el tiempo ha aprendido a pensar en el asunto con gran serenidad. Casi cada día, desde hace ya años, toma la pluma y le escribe. No tiene nombre y no tiene señas para poner en los sobres, pero tiene una vida que contar. Y ¿a quién sino a ella? Él cree que cuando se encuentren será hermoso depositar en su regazo una caja de caoba repleta de cartas y decirle

-Te esperaba.

Ella abriría la caja y lentamente, cuando quiera, leerá las cartas una a una y retrocediendo por un kilométrico hilo de tinta azul recobrará los años –los días, los instantes- que ese hombre, incluso antes de conocerla, ya le había regalado. O tal vez, más sencillamente, volcará la caja y, atónita ante aquella divertida nevada de cartas, sonreirá diciéndole a ese hombre

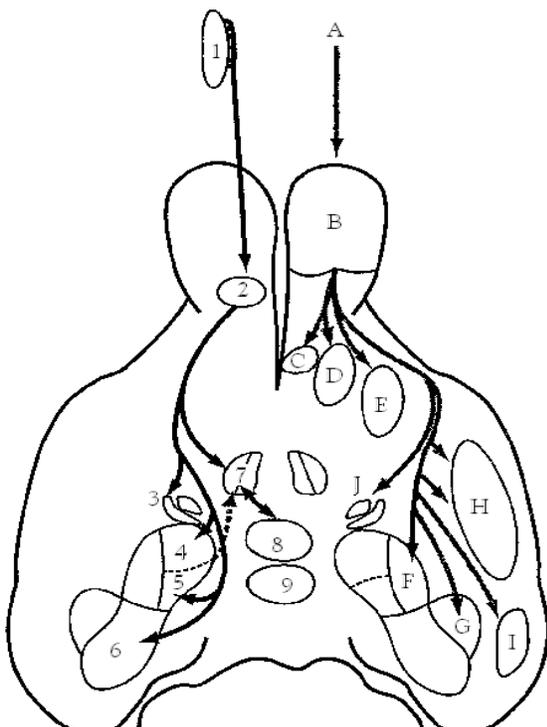
-Tú estás loco.

Y lo amaré por siempre”.

1 Introducción:

El sistema olfatorio es importante para regular funciones neuroendócrinas, reproductoras, maternas y de agresión. También participa en el reconocimiento de individuos de la misma especie, predadores y presas. La olfacción también es necesaria para seleccionar correctamente los alimentos, así como en la determinación de su sabor ya que estos resultan de la integración de señales olfatorias y gustativas. Se acepta que las señales olfatorias juegan un papel decisivo en el control de la conducta y en algunos procesos de memoria, pero los mecanismos neurales involucrados en la percepción de los olores todavía no están bien comprendidos (Paxinos, 2004). Las señales que procesa el sistema olfatorio y que regulan la conducta se llaman feromonas y pueden tener distintos orígenes: los olores típicos de la especie, del sexo e individuales resultan de la expresión de ciertos genes, mientras que la información correspondiente al estatus social, la fase estral y la maternidad dependen del estado hormonal del individuo (Johnston, 1998). En los mamíferos, la correcta secreción, detección e interpretación de la información dada por estas señales químicas está involucrada en el desarrollo de una gran variedad de conductas, como son: la atracción de la pareja, el bloqueo de la pubertad, el estado estral y la preñez. También controlan el reconocimiento individual, relaciones madre-cría y el despliegue de conductas de agresión. Los mamíferos utilizan la orina como la mayor fuente de secreción de sustancias químicas para el inicio de conductas mediadas por feromonas (Paxinos, 2004).

El sistema olfatorio de los mamíferos consta de dos vías neurales, la vía principal y la accesoria (fig. 1), estas vías difieren en sus elementos. Los elementos periféricos del sistema olfatorio principal (SOP) incluyen al epitelio olfatorio y al bulbo olfatorio principal (BOP), mientras que los constituyentes periféricos del sistema olfatorio accesorio (SOA) son el bulbo olfatorio accesorio (BOA) y el órgano vomeronasal (OVN) que actúa como una bomba de aire, dilatándose y contrayéndose de manera voluntaria (Las vías se pueden observar en la fig 1). Esta característica del OVN hizo pensar que había evolucionado para detectar y procesar olores no volátiles, donde el sistema de bombeo facilita la entrada a estos compuestos olfatorios pesados, o de naturaleza no volátil a la vía accesoria. Hasta hace pocos años se aceptaba que el SOP podía procesar señales olfatorias volátiles dadas por el medio ambiente y que el SOA estaba limitado a procesar señales químicas no volátiles producidas por conespecíficos, entre ellas las feromonas (Scalia y Winans, 1975 ; Meredith, 2001 ; Xu y cols., 2005). Sin embargo nueva evidencia ha cuestionado si las feromonas son únicamente de índole no volátil, y si su detección es exclusiva del SOA. Por ejemplo, Sachs (Sachs y cols., 1994) reportó que olores volátiles provenientes de hembras en estro pueden provocar erecciones sin contacto en ratas con y sin experiencia sexual. Además reportó mayor activación de c-Fos, un gen de estimulación temprana frecuentemente utilizado como indicador de activación neuronal en pruebas conductuales



neuronal en pruebas conductuales (Hoffman y cols., 1993), en el Área Preóptica Medial / Hipotálamo anterior (APM/HA) y en el BOP sin embargo no hubo expresión en el BtOA, por lo que interpretó que ciertas feromonas pueden ser procesadas por el SOP y después continuar la vía neural del SOA. En este sentido también se han hecho estudios.

Fig 1. *Vías de proyección de ambos sistemas olfatorios en un cerebro de roedor. A la izquierda observamos la vía accesoria y en la derecha la vía principal. El bulbo olfatorio accesorio (2) recibe proyecciones del órgano vomeronasal (1) este manda aferencias a la amígdala (4 y 5) y al núcleo lecho de la estria terminal (NLET) (7). Los núcleos de la amígdala medial anterior y posterior proyectan al NLET y por último este proyecta al área preóptica (8). El BOP (B) recibe proyecciones del epitelio olfatorio (A) y proyecta al núcleo cortical anterior (F) y posterolateral de la amígdala (G). El BOP tiene numerosas proyecciones corticales como la taenia tecta (C), el núcleo olfatorio anterior (D), el tubérculo olfatorio (E), la corteza periforme (H) y entorinal (I). Adaptado de (Winans y Powers, 1977)*

con hembras en donde se mostró que las hembras expuestas a olores volátiles mostraban preferencia por los olores de machos sexualmente expertos y no por los olores de machos castrados (Scott Pfaff 1970, Jemiolo Alberts 1985). También se conoce que los genes de histocompatibilidad, que son moléculas secretadas por el sistema inmune de los individuos a partir de su genoma y que brindan información sobre la salud genética y divergencia haplotípica de los individuos, son reconocidas por receptores en el BOP (Yamazaki 1976). Es importante recalcar que la colaboración de los dos sistemas olfatorios todavía no es totalmente clara, pero hay estudios que demuestran una comunicación a nivel del BOP/BOA (36).

Uno de los propósitos de este trabajo, es responder a la pregunta de si las señales volátiles y el SOP participan en el procesamiento de claves quimiosensoriales sexualmente relevantes para el reconocimiento de pareja.

2 Señales Olfatorias Sexualmente Relevantes

Uno de los principales problemas en el estudio de la olfacción y como regula la conducta es el uso indiscriminado del término “feromona”. En la definición clásica dada por Karlson y Luscher (1959) el nombre de feromona se da a “una sustancia química que lleva información sobre el estado fisiológico o conductual del individuo a un conoespecífico, resultando en una reacción específica y preprogramada del receptor”. No es claro si las feromonas son compuestos simples y/o un mosaico

de compuestos que activan una determinada conducta. Se ha tratado de clasificar a estas señales químicas de acuerdo a su complejidad y el tipo de conducta que desencadenan. Por su complejidad molecular se dividen en; 1) *feromonas simples* o *clásicas*, que son compuestos moleculares sencillos identificados por primera vez en insectos; 2) *feromonas compuestas*, que son mezclas de un número de pequeños compuestos químicos que solo son efectivos en ciertas concentraciones específicas para cada uno; 3) *señales olfatorias de calidad* (del inglés: *odor-quality signs*), que son grandes complejos de compuestos químicos cuya importancia y significado dependen de las concentraciones de los mismos y del estado fisiológico del receptor. Por los efectos conductuales que originan se dividen en; 1) *feromonas iniciadoras* (del inglés: *primming*), que tienen un efecto inmediato en la conducta como la atracción de la pareja o el inicio de la agresión; y en 2) *feromonas liberadoras* (del inglés: *releasing*), que tienen efectos a largo plazo, como el inicio prematuro de la madurez sexual de las hembras juveniles en presencia de machos activos, o el bloqueo de la preñez en presencia de un macho extraño.

Johnston (2000) señala cinco puntos importantes a considerar cuando se trabaja con comunicación química: 1) Existen una gran variedad de tipos de señales, desde las feromonas clásicas descritas hasta una variedad de moléculas que también son importantes para la comunicación química. 2) El SOA es, en gran medida, responsable del procesamiento y detección de la mayoría de las feromonas. 3) El SOP puede responder a algunas feromonas. 4) El SOA responde a algunas señales olfatorias volátiles provenientes del medio ambiente. 5) La mayoría de las ocasiones, el SOA y el SOP interactúan para mediar respuestas a estímulos olfatorios, como ya dijimos, se sabe que hay comunicación al menos a nivel de los BOA y BOP.

Con base en lo anterior podemos decir que la gran diversidad de señales relacionadas con la comunicación química de los vertebrados no está dada sólo por feromonas clásicas. El procesamiento de estas señales debe estar regulado por uno o los dos sistemas olfatorios. Además, no podemos descartar otros

factores del receptor, como el estado hormonal, el estrés y la experiencia sexual entre otros para el desencadenamiento de ciertas conductas. Justo, uno de los propósitos de este trabajo es tratar de dar luz a los tipos de señales que pueden procesar los diferentes sistemas olfatorios y el tipo de conductas que pueden desencadenar.

3 Experiencia Sexual

La experiencia sexual parece ser un factor importante en la respuesta conductual a las feromonas. Machos sexualmente inexpertos con lesión en el OVN no logran iniciar la cópula en presencia de una hembra receptiva, mientras que los machos sexualmente expertos, con la misma lesión, no muestran déficit en sus patrones de conducta sexual. Las lesiones en el SOP no provocan ninguna disminución en la conducta en machos expertos o inexpertos, lo que sugiere que la integridad de cualquiera de los dos sistemas olfatorios es suficiente para ejecutar la conducta después de haber adquirido experiencia sexual (Meredith, 1986). Hembras con y sin experiencia sexual resultan atraídas hacia moléculas no volátiles inmersas en el aserrín donde se alojaron machos expertos, pero solo las hembras con experiencia resultan atraídas por compuestos volátiles de la orina de machos sexualmente activos. Esto sugiere que, al igual que los machos, es necesaria la experiencia sexual para asociar olores volátiles sexualmente relevantes.

Se ha postulado que la amígdala (AMG), que forma parte de ambas vías olfatorias, puede agregar un valor negativo o positivo a un estímulo olfatorio, lo que resulta en conductas de aversión o atracción. Con base en lo anterior, se sabe que algunos estímulos detectados por el OVN tienen un valor emotivo intrínseco, como las feromonas o señales químicas secretadas por presas o predadores, mientras que los olores volátiles asociados a individuos del sexo opuesto son adquiridas con la experiencia sexual. Esto último puede ser debido al reforzamiento y aumento entre las conexiones neurales de la AMG y el continuo del área preóptica medial/hipotálamo anterior (APM/HA), que también forma parte de ambos sistemas olfatorios y además es conocida por su importancia en la

regulación de la motivación sexual masculina (Meredith, 2002 ; Moncho-Bogani y cols., 2002 ; Moncho-Bogani y cols., 2005). A continuación se hará una breve descripción del SOA y de sus estructuras.

4 Sistema Olfatorio Accesorio (SOA)

El SOA o sistema de proyección vomeronasal (fig. 2) es el principal mediador de feromonas que desencadenan cambios fisiológicos y hormonales preprogramados y estereotipados como la liberación de hormona luteinizante que acelera la pubertad de las hembras cuando están en contacto con señales olfatorias de machos sexualmente activos (efecto Whitten), o la liberación de testosterona en los machos cuando entran en contacto con hembras receptivas. También procesa la información necesaria para la aceleración de la madurez sexual de hembras jóvenes en presencia de machos y el efecto Bruce (que es la pérdida de la preñez en ratones hembras que acaban de copular con un macho ante el olor de la orina de un segundo macho) entre otros (Dulac, 2000 ; Meredith, 2001). Se ha demostrado que sustancias químicas a concentraciones picomolares activan los receptores del OVN (Zufall y Leinders-Zufall, 2000). Estos receptores son capaces de responder de manera específica a ciertas moléculas olfatorias únicamente. Estas características hacen al SOA capaz de detectar feromonas simples o mezclas de ellas, dentro de un contexto químico complejo (olores corporales y ambientales). Se cree que los cambios fisiológicos y hormonales dados por la estimulación del SOA están mediados por proyecciones de este sistema a zonas límbicas, como la amígdala medial y posteromedial, el núcleo lecho de la estría terminal, así como al área preóptica medial, una de las áreas críticas para la conducta sexual masculina (Johnston, 1998 ; Meredith, 1998). A continuación describiremos las estructuras del SOA y algunas evidencias que demuestran que son importantes en el control de la conducta sexual.

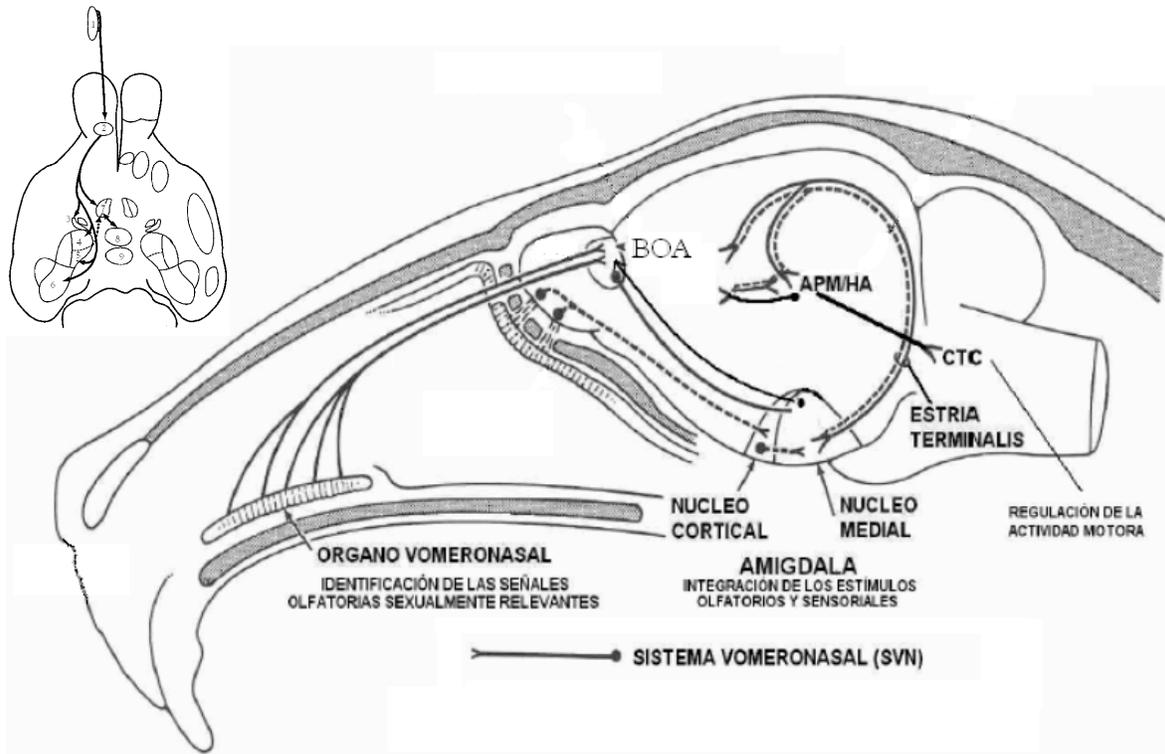


Fig 2. Vista sagital del sistema vomeronasal (Modificado de Baum, 1992)s

4.1 Órgano Vomeronasal (OVN)

El OVN Es una estructura quimiorreceptora fusiforme que se encuentra bilateralmente localizado en la parte más rostral del septum nasal. Es regulado desde el nacimiento por esteroides gonadales y el mantenimiento de su morfología depende de la secreción de hormonas durante la edad adulta (Segovia y Guillamon, 1982). La interacción de ciertas moléculas olfatorias en el epitelio vomeronasal modifica la secreción de hormonas esteroides y desencadena cambios fisiológicos y conductuales. (Fleming, 1979 ; Saito y Mennella, 1986 ; Romero y *co/s.*, 1990). La importancia del OVN para el inicio y mantenimiento de la conducta sexual masculina se ha estudiado mediante diversas técnicas de lesión. La remoción del OVN en ratas macho sexualmente expertas sólo incrementa la latencia de la primera intromisión y disminuye el número de intromisiones, pero todos los animales son capaces de eyacular. En machos

inexpertos, si hay disminución en el porcentaje de machos que eyaculan (Saito y Moltz, 1986 ; Kondo y cols., 2003). No se observan cambios en las erecciones espontáneas inducidas por los olores de hembras sexualmente receptivas, aunque se propone que la percepción de estas señales es procesada por el SOP (Kondo y cols., 1999). La lesión del OVN modifica la actividad de las otras estructuras que componen la vía del SOA, se ha demostrado que, al extraer el OVN íntegramente, disminuye el número de neuronas que responden, evaluado por c-Fos, inducido por la cópula en la capa granular del BOA así como en la amígdala medial (Kondo y cols., 2003).

4.2 Bulbo Olfatorio Accesorio (BOA)

El BOA es una estructura que se localiza en la porción dorsal del bulbo olfatorio principal, en sentido dorsocaudal (Paxinos y Watson, 1997) El nervio del órgano vomeronasal transmite información desde el OVN hasta el glomérulo del BOA. El BOA proyecta directamente al núcleo del tracto olfatorio accesorio y a la amígdala medial. Las neuronas del BOA expresan receptores a esteroides (Shughrue y cols., 1997a ; Shughrue y cols., 1997b), los cuales pueden ser modulados directamente por las hormonas circulantes. El desarrollo de esta estructura se encuentra influenciado por esteroides gonadales (Roos y cols., 1988), y se ha observado que es más grande en la rata macho que en la hembra. El BOA se ha relacionado con la inhibición de la conducta sexual, en la participación de ciertas respuestas endocrinas como la agresión y la habituación, entre otras (Edwards, 1974). La lesión en esta estructura genera cambios más drásticos en la conducta copulatoria, ya que al extraer el BOA se observa una disminución del número de animales que eyacula. Esta alteración es debida a la dificultad de los machos para iniciar la cópula (Larsson, 1969 ; 1975), y para mantenerla una vez iniciada (Meisel, 1980). Las lesiones en esta estructura tienen una mayor influencia en la conducta sexual en machos inexpertos que en expertos (Bermant, 1969). Un resultado más dramático se obtiene al hacer una bulbectomía, ya que esto produce una pérdida completa de la conducta sexual en los machos inexpertos (Winans y Powers, 1977). Edwards y cols. (1990) demostraron que la bulbectomía

además de inhibir la conducta sexual, disminuye la preferencia de pareja debido a un deterioro en la capacidad para percibir señales quimio-sensoriales sexualmente relevantes que impiden al macho discriminar el olor de sus conespecíficos como posibles parejas sexuales. Además se postula que la memoria olfatoria se encuentra contenida en los circuitos reverberantes entre las neuronas de las capas mitrales y granulares de esta estructura, dado que las la administración de fármacos que inhiben temporalmente a esta estructura logran evitar el efecto Bruce (Binns y Brennan, 2005).

4.3 Amígdala (AMG)

La amígdala está relacionada con una gran variedad de conductas y funciones reguladoras, como las emociones, la memoria, la modulación de los sistemas autónomos y neuroendocrinos, la reproducción y la agresión (Barros y cols., 2003; Dominguez y cols., 2001; Wintink y cols., 2003) Esta estructura también presenta diferencias sexualmente dimórficas, siendo más grande en los machos que en las hembras (Segovia y Guillamon, 1996). Se ha demostrado que el tamaño de este núcleo depende de las hormonas gonadales ya que la gonadectomía disminuye el tamaño de la amígdala en los machos. Esta disminución se revierte mediante el reemplazo hormonal con testosterona o con sus metabolitos (Cooke y cols., 1999 ; Cooke y cols., 2003). La amígdala recibe información, entre muchas otras estructuras, de los bulbos olfatorios y del OVN. La información es procesada en esta estructura antes de proyectar al área preóptica medial. La amígdala medial es el blanco de la vía del SOA, y presenta receptores tanto para los andrógenos como para los estrógenos (Stumpf y cols., 1982 ; Simerly y cols., 1990). Las lesiones en la amígdala córtico-medial alteran los patrones de cópula, aumentando la latencia de monta y de eyaculación, así como los intervalos inter-intromisiones. Los machos también realizan un mayor número de intromisiones antes de eyacular (Kondo y Sachs, 2002). Por el contrario, las lesiones en la amígdala basolateral no tienen efectos sobre la conducta sexual masculina (Harris y Sachs, 1975).

Núcleo del lecho de la estría terminal (NLET)

El núcleo del lecho de la estría terminal (NLET) es una estructura sexualmente dimórfica, siendo más grande en los machos (Segovia y Guillamon, 1996). Establece conexiones recíprocas con la amígdala medial y el área preóptica medial. La lesión de este núcleo incrementa el número de montas e intromisiones necesarias para la eyaculación, así como el intervalo inter-intromisión y la latencia de eyaculación (Emery, 1976 ; Claro y cols., 1995 ; Liu y cols., 1997). Es importante destacar que las lesiones del NLET y de la amígdala corticomediales tienen efectos conductuales muy parecidos, lo que sugiere que es un relevo de información desde la amígdala a otras áreas, como el área preóptica medial (Benjamin, 1982). Otros autores sugieren que el NLET es una extensión de la amígdala (Allison, 1953). El NLET y la amígdala corticomediales están principalmente involucrados en el mantenimiento de la conducta copulatoria y de la eyaculación. Aparentemente, también integran las vías neuronales que controlan parcialmente el inicio de la conducta copulatoria y su reinicio después de una eyaculación (Emery, 1976).

4.4 Área preóptica medial (APM/HA)

El APM/HA se localiza entre la porción caudal del quiasma óptico y la comisura anterior, tiene como borde rostral y caudal a la lámina terminal y la división media del NLET respectivamente. Las neuronas del APM/HA concentran receptores para andrógenos y estrógenos (Pfaff, 1973). Por sus diversas conexiones a diferentes partes del cerebro se le atribuyen diversas funciones como la regulación endocrina de la gonadotropina pituitaria, liberación de prolactina, termorregulación, conducta materna y sexual (Conrad y Pfaff, 1976 ; Chiba y Murata, 1985 ; Simerly y Swanson, 1986 ; Singer y cols., 1987). La importancia de esta región en el control de la conducta sexual se describirá con detalle más adelante.

5 Sistema Olfatorio Principal (SOP)

En el sistema olfatorio principal (fig. 3), las moléculas volátiles son transducidas por neuronas receptoras olfatorias de primer orden inmersas en el epitelio olfatorio localizado dentro de la cavidad nasal. Estas neuronas proyectan sus axones por el nervio olfatorio hacia el BOP donde hay retroalimentación antes de seguir la ruta neural. Las moléculas volátiles deben entrar en la cavidad nasal para que se estimulen las neuronas receptoras, las cuales están sujetas a corrientes de aire relativamente turbulentas dentro de la nariz. La duración, y la velocidad del olfateo son factores importantes para la eficiencia de la estimulación olfativa (para una revisión ver Paxinos 2004). Una vez que se lleva a cabo la transducción de la señal química a eléctrica, ésta llega al BOP por el nervio olfatorio. En general se sabe que una región del BOP recibe eferencias de neuronas receptoras de cualquier parte del epitelio, sin embargo existe una tendencia de organización somatotópica. (Astic y Saucier, 1986).

El BOP tiene una organización laminar, la capa más superficial es la del nervio olfatorio, que contiene las fibras sin mielina de las neuronas receptoras y células gliales. Inmediatamente después se encuentra la capa glomerular. Los glomérulos son estructuras esféricas cubiertas por una capa de neuronas pequeñas y glía, en esta capa se da la sinapsis entre los axones de las neuronas receptoras y las dendritas de las neuronas mitrales. Después de la glomerular se encuentra la plexiforme externa, que tiene poca densidad de somas, y una gran cantidad de glia y de dendritas de neuronas mitrales y en penacho. Le sigue en profundidad la capa mitral; es muy delgada y tiene los somas de las neuronas mitrales que proyectan sus axones, junto con las de penacho, a las demás estructuras de la vía después de que el estímulo fue regulado en las capas anteriores. La capa más interna del BOP es la plexiforme interna, donde se localiza una gran cantidad de fibras que conectan con la corteza olfatoria y la amígdala.

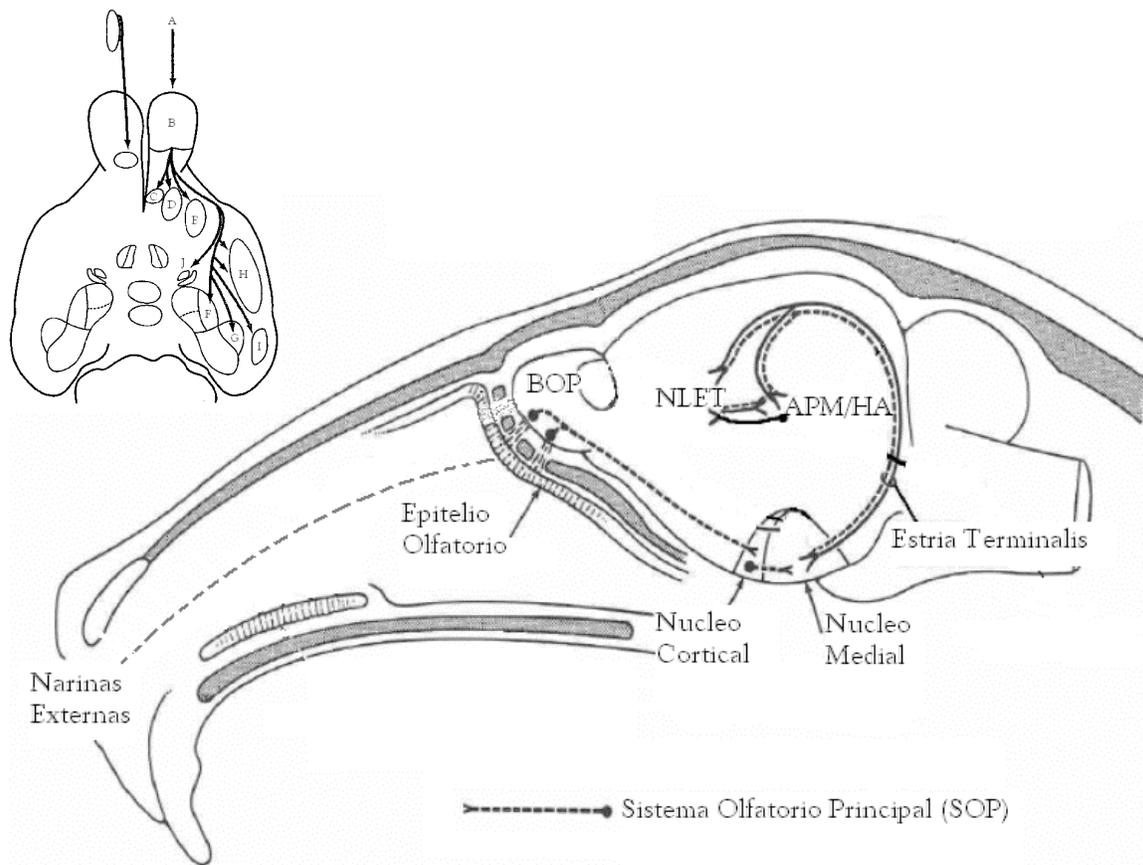


Fig.3 Vía de proyección del sistema olfatorio principal. El compuesto químico entra a través de las narinas y encuentra a su receptor en el epitelio olfatorio donde se transluce la señal y se proyecta al BOP, este proyecta a núcleos corticales como la taenia tecta, el núcleo olfatorio anterior, el tubérculo olfatorio, la corteza periforme y entorinal, y proyecta axones al núcleo cortical y medial de la AMG donde comparte sus proyecciones con la vía accesoria. La estría terminalis transfiere la información de la AMG al núcleo del lecho de la estría terminalis, finalmente el NLET proyecta sus axones al área preóptica medial (APM/HA). (Modificado de Baum 1992)

El BOP proyecta a una serie de estructuras que se conocen colectivamente como corteza olfatoria primaria (de Olmos y cols., 1978), que se subdividen en tres

grupos: a) el núcleo olfatorio anterior; b) la corteza olfatoria medial que comprende el indusium griseum, la continuación hipocampal anterior, la taenia tacta, la corteza infralímbica y el tubérculo olfatorio; c) la corteza olfatoria lateral que comprende a la corteza piriforme, la periamigdalóide, la transicional y la entorrinal (Paxinos, 2004). A continuación se describe brevemente la anatomía de estos núcleos:

a) El núcleo olfatorio anterior se encuentra interpuesto entre el BOP y la corteza piriforme, es una estructura compuesta de una capa plexiforme y una capa de células empaquetadas muy homogénea, excepto por la zona central (Haberly y Price, 1978a ; b). Esta estructura recibe aferencias de la capa mitral del BOP, también tiene aferencias moduladoras provenientes del raphe (McLean y Shipley, 1987) y del locus coeruleus (McLean y cols., 1993). Tiene eferencias al BOP, pero la mayoría de ellas van a la corteza piriforme, al tubérculo olfatorio y a la porción temporal de la capa CA1 del hipocampo (Luskin y Price, 1983a, b).

b) Como ya mencionamos, la corteza olfatoria medial está compuesta por varias estructuras de gran complejidad celular, por lo que han sido poco estudiadas, a continuación mencionaremos algunas de las aferencias y eferencias principales de cada una de ellas: el Indusium Griseum (IG) tiene aferencias del BOP y de la corteza entorrinal y tiene eferencias hacia el giro dentado. La continuación hipocampal anterior tiene las mismas aferencias y eferencias que el IG, con la diferencia que este núcleo si proyecta al BOP, además proyecta a los cuerpos mamilares y al núcleo talámico (de Olmos y cols., 1978 ; Adamek y cols., 1984). La taenia tacta proyecta principalmente al BOP (de Olmos y cols., 1978 ; Shipley y Adamek, 1984). La corteza infralímbica se ha relacionado como un vínculo entre el sistema autónomo y el olfatorio, debido a sus conexiones con diversos núcleos del sistema autónomo. El tubérculo olfatorio recibe aferencias de las células mitrales y en penacho del BOP.

c) Esencialmente la corteza olfatoria lateral está compuesta por cuatro estructuras corticales: La piriforme, la periamigdalóide, la transicional y la entorrinal, todas ellas reciben aferencias del BOP y todas ellas están interconectadas entre sí. Estas áreas están implicadas en procesos cognitivos,

conductuales, emocionales y de memoria (Johnston y Peng, 2000 ; Paxinos, 2004).

CAPÍTULO II.

“Solo, en medio de la playa, Bartleboom miraba... Estudiaba el punto exacto en el que la ola, después de haber roto una decena de metros más atrás, se extendía subiendo por la delicada pendiente de la playa y al final se detenía... En el círculo imperfecto de su universo óptico, la perfección de aquel movimiento oscilatorio formulaba promesas que la irrepetible unicidad de cada ola en sí condenaba a no ser mantenidas. Sus ojos buscaban la verdad descriptible y reglamentada de una imagen segura y completa; y acababan, por el contrario, corriendo detrás de la móvil indeterminación de aquel ir y venir que a cualquier mirada científica adormecía y burlaba.

Resultaba molesto. Era necesario hacer algo. Detuvo los ojos. Los fijó delante de los pies, encuadrando un trozo de playa mudo e inmóvil. Y decidió esperar. Antes o después entraría –en el marco de aquella mirada que él suponía memorable en su científica frialdad- el perfil exacto, respunteando espuma, de la ola que esperaba. Y allí se quedaría fijada, como una huella en su mente. Y él la *entendería*. Se sumergió en una inmovilidad sin sentimientos, transformándose, por así decirlo, en neutral e infalible instrumento óptico. Casi no respiraba. Sobre el círculo fijo recortado por su mirada cayó un silencio irreal, de laboratorio...

-¿Y qué es lo que hay que estudiar?

-Bueno, es un punto importante..., a veces no se le presta atención, pero pensándolo bien ahí sucede algo extraordinario, algo... extraordinario.

-¿De verdad?

-Bartleboom se acercó ligeramente a la mujer. Se hubiera dicho que tenía un secreto que decir cuando dijo

-Ahí acaba el mar...”

Fragmento de Océano mar
Alessandro Baricco

6 Conducta Sexual

La reproducción de las especies sexuadas necesita una serie de interacciones entre diversos sistemas fisiológicos y de un repertorio conductual específico, llamado comportamiento sexual (Larsson, 1979). Este comportamiento opera bajo dos mecanismos: uno motivacional que lleva al individuo a la búsqueda y al inicio de la interacción con la pareja sexual y otro consumatorio o ejecutorio que permite llevar a cabo la cópula (ver figura 4). El mecanismo de búsqueda de un incentivo sexual es el interés que muestra el sujeto para encontrarse con una potencial pareja sexual y aunque no es fácil definirlo ni medirlo, puede inferirse a través de diversas conductas. Por ejemplo, cuantificando la activación de una palanca, el tiempo que pasa cerca del estímulo sexual en una arena, la velocidad en la que se recorre un laberinto para llegar con un macho o una hembra sexualmente activa, entre otros. Por otro lado, el componente consumatorio o ejecutorio es altamente estereotipado. Agmo (2002) sugiere que ambos mecanismos pueden llevarse a cabo de manera independiente y que son gobernados por distintos mecanismos neurales y conductuales. Para que la fase consumatoria se lleve a cabo es necesario que exista una conducta de aproximación (búsqueda del incentivo sexual), sin embargo, estas conductas de aproximación no necesariamente culminan con la fase ejecutoria.

La motivación es un constructo hipotético que hace referencia a una fuerza que impulsa al individuo a realizar una conducta tomando en cuenta no sólo factores internos, sino también externos (Toates, 1981). Esto es, que el individuo se ve impulsado a la consecución de una meta. Las estructuras cerebrales más relacionadas con los procesos motivacionales y emocionales son aquellas pertenecientes al sistema límbico, entre ellas la amígdala, que forma parte del sistema de proyección vomeronasal y del sistema olfatorio principal. La motivación sexual es diferente a otro tipo de motivaciones como la de ingesta, sed o de

respuesta al peligro, todas ellas responden a una necesidad de supervivencia del organismo, pero la abstinencia sexual de un organismo no tiene repercusiones a corto plazo. A diferencia de las motivaciones primarias, como la ingesta o la sed que, para saciarlas no necesitan la presencia de un compañero sexual, en el caso de la motivación sexual, la necesidad de iniciar el patrón de la cópula, es activado por la presencia de una pareja adecuada y si esta no se encuentra no habrá repercusiones acumulativas en el organismo (Agmo, 2003).

En la conducta sexual de la rata macho se observan tres fases: las conductas precopulatorias, las copulatorias y las postcopulatorias. Las conductas precopulatorias consisten básicamente en el olfateo y exploración anogenital y en el aseo de la pareja (Hlinak, 1986, 1987, 1990). Durante este periodo los roedores de ambos sexos suelen emitir vocalizaciones ultrasónicas que tienden a aumentar la excitación de la pareja (Pomerantz y Clemens, 1981 ; Knutson y *co/s.*, 2002). También se ha demostrado que si la estimulación precopulatoria producida no es la adecuada es muy probable que la cópula no se lleve a cabo (Paredes y Agmo, 1989). En la fase copulatoria la rata despliega una serie de patrones de montas e intromisiones (ver figura 4) que culminan con la eyaculación (Meisel y Sachs, 1994). En la monta, el macho abraza con sus miembros anteriores el flanco de la hembra, presenta movimientos pélvicos y finaliza desmontando lentamente. La intromisión es una monta con movimientos pélvicos más prolongados y profundos seguida de una desmonta rápida y brusca donde se presupone que hay penetración vaginal. La eyaculación es una intromisión que termina con un movimiento pélvico brusco, mantenido por algunos segundos finalizando cuando el macho desmonta lentamente con un movimiento lateral de los miembros anteriores (Meisel y Sachs, 1994).

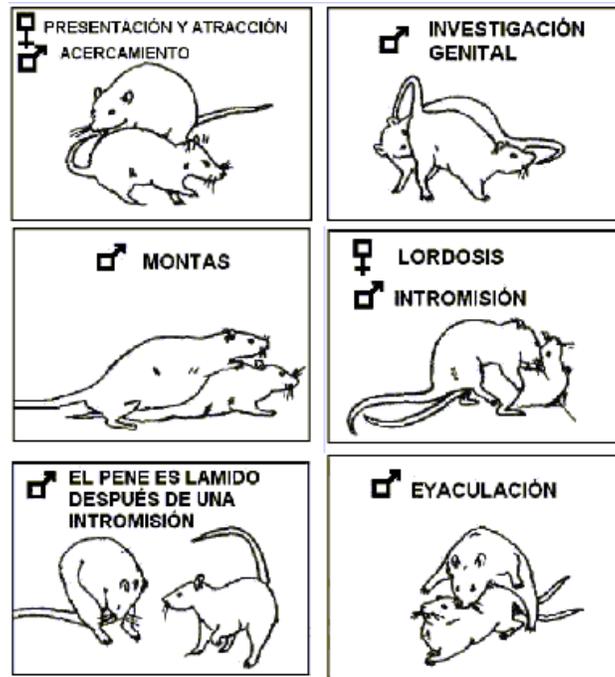


Fig.4 Patrones de conducta sexual en la rata macho. Primero existe un acercamiento hacia la pareja, luego hay una investigación y reconocimiento por medio del olfateo anogenital. Después se realizan varias montas e intromisiones antes de llegar a la eyaculación. (Modificado de(Slob, 1997 #784)

La fase postcopulatoria es el intervalo que se presenta entre la eyaculación del y la primera intromisión del siguiente ciclo copulatorio. Tiene dos fases; el *intervalo posteyaculatorio absoluto* caracterizado porque el macho no tiene actividad sexual y emite vocalizaciones características; y el *intervalo posteyaculatorio relativo* en el que el macho realiza una serie de montas sin lograr la intromisión (Pollak y Sachs, 1975).

Son varias las estructuras cerebrales involucradas en el control de la conducta sexual, entre ellas algunas de las previamente descritas que procesan los estímulos olfatorios. Una descripción detallada de las evidencias que involucran a estas estructuras en el control de la conducta sexual puede encontrarse en revisiones especializadas en el tema (Paredes 2003; Paredes y Baum 1997). Un análisis detallado de esta literatura demuestra que dentro de todas las estructuras

cerebrales estudiadas, la que parece ser fundamental para la expresión de la conducta sexual es el APM/HA. En el siguiente inciso describiré las evidencias, algunas de ellas realizadas en nuestro laboratorio, que demuestran que esta región cerebral es crucial en el control de la conducta sexual masculina.

7 APM/HA y Conducta Sexual

Desde los primeros estudios realizados en 1941 (Brookhart y Dey, 1941), se demostró que las lesiones en el APM/HA producían la pérdida total de la conducta sexual masculina en conejillos de indias. Resultados similares se describieron en 1954 (Hillarp y cols., 1954) y en 1956 (Soulariac y Soulariac, 1956) donde se demostró la pérdida de la conducta sexual masculina por lesiones bilaterales extensas en el APM/HA. Por otro lado, lesiones más pequeñas o unilaterales no tienen el mismo efecto, ya que las alteraciones en la conducta sexual son leves y temporales y los machos recuperan la conducta (Lisk, 1968). La pérdida de la conducta sexual se obtiene con diferentes tipos de lesión en el APM/HA, ya sean lesiones químicas reversibles como el uso de lidocaína o irreversibles como el ácido iboténico, eléctrolíticas, mecánicas y con radiofrecuencia. Los estudios hechos con lesiones quimiotóxicas han demostrado que son las neuronas contenidas en el APM/HA las responsables de la pérdida de la conducta sexual masculina dado que este tipo de lesión solo afecta a los somas de la región donde se aplican y dejan intactos los axones de paso (Szechtman y cols., 1978 ; Hansen y cols., 1982 ; Lupo y cols., 1983 ; Hurtazo y cols., 2004). Además, esta estructura es filogenéticamente muy importante, ya que los efectos de las lesiones del APM/HA se han descrito en varias especies de vertebrados incluyendo: ratas, ratones, hurones, conejillos de indias y borregos entre otros. (Heimer y Larsson, 1966/1967 ; Meisel y Sachs, 1994). Sin embargo, los estudios endócrinos y conductuales más detallados están hechos en ratas.

Para un adecuado despliegue de la conducta sexual masculina el papel del APM/HA es fundamental, ya hemos dicho que las lesiones del APM/HA inhiben

por completo la conducta sexual, cabría esperar que la estimulación directa de esta área facilite el inicio de esta conducta, esto es así. De hecho 3 horas después de lesiones pequeñas del APM se observa una facilitación de la conducta sexual (Paredes y Agmo, 1992). En animales intactos, la estimulación eléctrica de esta región también facilita la conducta sexual (Paredes y cols., 1990a ; Paredes y cols., 1992). Por otro lado machos que han dejado de copular debido a una lesión en el APM/HA han recuperado la conducta con implantes de tejido cerebral fetal (Paredes y cols., 1990b). También se sabe que la conducta sexual masculina en ratas castradas se ve reestablecida con implantes de testosterona en esta área, pero no se reestablece si estos se implantan en cualquier otra región adyacente (Balthazart y cols., 1990 ; Balthazart y Surlemont, 1990). Algunas de las conductas socio-sexuales, como la persecución de la hembra, se ven alteradas significativamente cuando se lesiona esta región (Paredes y Baum, 1997).

Nuestro grupo de trabajo ha estudiado detalladamente a las ratas macho “no copuladoras” considerando que si logramos entender por qué animales aparentemente normales no despliegan la conducta podríamos explicar cómo se genera la conducta en condiciones normales.. Estas ratas, aparentemente normales, no logran llevar a cabo el patrón de conducta sexual aunque sean probadas en repetidas ocasiones con hembras sexualmente receptivas (Anderson, 1936; Paredes y cols., 1990a). Esta inhibición de conducta no es dada por una alteración endocrina, ya que el tratamiento con testosterona no induce conducta sexual en los machos no copuladores. Además, los niveles de testosterona en el plasma, así como las funciones eréctiles y eyaculatorias son similares entre las ratas normales y estas ratas “no copuladoras” (Portillo y cols., 2006), dado que el déficit conductual de estos animales no es resultado de un desajuste hormonal ni fisiológico, hemos sugerido que estos animales pueden tener algún tipo de alteración funcional en el APM/HA. Dado que el kindling (estimulación eléctrica repetida aplicada a estructuras del sistema nervioso para provocar crisis epilépticas) en el APM/HA, y no en ninguna otra estructura cerebral, hace que los

individuos no copuladores inicien el patrón de conducta sexual (Dominguez-Salazar y cols., 2003).

Se han propuesto tres hipótesis para explicar el papel del APM/HA en el control de la conducta sexual. La primera sugiere que las neuronas de esta área controlan los aspectos consumatorios, la segunda sugiere que está involucrada en la parte motivacional de la conducta y la tercera que esta involucrada en ambos aspectos. Nuestro grupo de trabajo está interesado en emplear nuevos métodos para evaluar la motivación sexual, se han hecho pruebas de motivación sexual incentiva, de preferencia de pareja y de preferencia olfatoria (Paredes y cols., 1993 ; Paredes y cols., 1998 ; Hurtazo, 2000 ; Dominguez-Salazar y cols., 2002 ; Portillo y Paredes, 2003 ; Portillo y Paredes, 2004). Nuestros resultados sugieren que el APM/HA está involucrada en aspectos motivacionales. Por ejemplo: demostramos que las ratas macho tienen una clara preferencia por el olor del aserrín expuesto a hembras en estro en comparación con aserrín limpio o de aserrín expuesto a machos sexualmente activos (Hurtazo, 2000). Después de la lesión del APM/HA esta preferencia se pierde y los animales pasan el mismo tiempo en el aserrín expuesto a hembras en estro y anestro. Estos mismos animales no muestran alteraciones en el procesamiento de claves olfatorias por el SOA evaluado con c-Fos. Sin embargo no sabemos si los machos con lesiones pierden la capacidad de discriminar entre los olores sexualmente relevantes. Si se demuestra que los machos pierden la capacidad de discriminar entre un estímulo sexualmente relevante de otro entonces podemos proponer que el APM/HA está involucrada en discriminación olfatoria. Si por el contrario no se pierde la discriminación olfatoria, el APM/HA podría estar involucrado en el control motivacional de la conducta. Así, en el presente trabajo pretendemos evaluar si las lesiones del APM/HA, que inhiben la conducta sexual, interfieren con la capacidad de discriminar estímulos olfatorios sexualmente relevantes utilizando una prueba para evaluar la discriminación olfatoria, que se describirá más adelante.

8 Hipótesis:

El APM/HA regula la discriminación de estímulos olfatorios sexualmente relevantes.

El APM/HA controla la motivación hacia un incentivo sexual.

9 Objetivos:

Determinar si la experiencia sexual interviene en la percepción y discriminación de estímulos olfatorios sexualmente relevantes

Determinar si la experiencia sexual interviene en la motivación hacia un incentivo sexual.

Definir si la lesión del APM/HA afecta la discriminación de estímulos olfatorios sexualmente relevantes y sexualmente no relevantes.

Definir si la lesión del APM/HA afecta la motivación hacia un incentivo sexual.

10 Método General.

10.1 Animales

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar con pesos entre 350 y 450 grs. y hembras entre 200-300 grs. de peso. Los animales fueron mantenidos en un ciclo invertido de luz-oscuridad (12:12), con libre acceso a comida comercial para rata (LabDiet, 5001 dieta para roedores) y agua. Las hembras fueron ovariectomizadas bilateralmente y se inyectaron con 25µg de benzoato de estradiol 48 horas antes y con 1mg de progesterona 4-6 horas antes de las pruebas conductuales para inducir niveles altos de receptividad y proceptividad. Las hormonas fueron disueltas en 0.2ml de aceite de maíz comercial, e inyectadas subcutáneamente. Todos los métodos fueron avalados por el comité de bioética del Instituto de Neurobiología.

10.2 Conducta Sexual

Se utilizaron cajas de observación rectangulares (40x60x40 cm.) de acrílico transparente donde se colocaron tanto los machos experimentales sexualmente expertos, como las hembras estímulo en estro. En estas pruebas se registraron el número de montas e intromisiones anteriores a la eyaculación, la latencia de monta, intromisión y eyaculación así como el intervalo post-eyaculatorio.

10.3 Grupos

Los machos experimentales fueron clasificados como:

- 1) *Machos sexualmente expertos*, aquellos sujetos que montaron, intrometieron y eyacularon en las tres pruebas de conducta sexual masculina con hembras en estro inducido.
- 2) *Machos sexualmente inexpertos*, aquellos que no fueron expuestos a hembras sexualmente receptivas.

Los animales estímulo fueron clasificados como:

- 1) *Machos sexualmente expertos*, de acuerdo al criterio de los machos experimentales sexualmente expertos.
- 2) *Hembras en estro*, aquellas hembras con tratamiento hormonal (como se describió anteriormente) que se encontraban en estro conductual a la hora de la colecta de orina.
- 3) *Hembras en anestro*, hembras ovariectomizadas que no fueron tratadas con hormonas antes de la colecta de orina.

10.4 Estímulos Olfatorios

Para las pruebas de discriminación de estímulos olfatorios sexualmente relevantes se obtuvo orina de los grupos estímulo de machos sexualmente expertos (n = 6), de las hembras en estro (n = 10) y de hembras en anestro (n = 10), es decir de hembras ovariectomizadas y sin tratamiento hormonal. Para obtener la orina se colocó a los animales estímulo en una plancha de metal previamente desinfectada dejándolos orinar sobre ella. La orina se recogió con una jeringa directamente de la superficie donde orinaron. Las ratas estímulo fueron manipuladas previamente para minimizar el estrés el día de la colecta de orina. La orina se almacenó a -12°C en alícuotas de 100 µl. Los estímulos olfatorios control (no sexualmente relevantes) fueron acetato de amilo y extracto de menta marca SURE. Dos ml de cada compuesto fueron disueltos en 5 ml de glicerol y el estímulo neutro fue agua desionizada.

10.5 Cirugía

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital (35mg/kg). Posteriormente fueron colocados en un aparato estereotáxico y la lesión fue producida por la aplicación de ácido quinolínico, un agonista a los receptores de NMDA (0.12 M en PBS a un pH de 7.4). Las coordenadas de la lesión a partir de bregma fueron las siguientes: 0 mm, en el eje anteroposterior; ±0.6 mm en el eje lateral y 8 mm en el eje dorsoventral a partir de la dura madre para llegar al APM/HA. Las lesiones

fueron bilaterales usando una jeringa Hamilton de 0.1 μ l. En cada lado se inyectaron a presión 0.5 μ l de ácido quinolínico durante 5 minutos, esperamos otros 5 minutos sin retirar la jeringa para evitar que se regresara por el canal de la aguja. Una semana después de la lesión, se realizaron las pruebas post-lesión.

10.6 Inmunohistoquímica

Al final del experimento los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico. Por vía intracardiaca fueron profundidos con 200 ml de solución salina (9%) seguido de 200 ml de paraformaldehído al 4% preparado en PBS 1M. Posteriormente se extrajeron los cerebros y se mantuvieron en paraformaldehído por 2 hrs. Finalmente los cerebros fueron almacenados en sacarosa al 30% para crioprotección. El cerebro fue cortado en rebanadas coronales de 30 μ m a nivel del APM/HA para la realización de una doble inmunohistoquímica para detectar proteína glial ácido fibrilar (GFAP) utilizando como anticuerpo anti-GFAP y para localizar la proteína neuronal nuclear (NeuN) utilizando anti-NeuN como anticuerpo. La GFAP se localiza únicamente en células gliales astrocíticas, estas células se incrementan cuando se produce una lesión neurotóxica La NeuN se localiza principalmente en el núcleo de las neuronas, de esta manera evaluamos indirectamente la proporción de muerte neuronal. (Truitt y Coolen, 2002)

11 Experimento 1.

Estandarización de la Prueba de Discriminación Olfatoria

11.1 Antecedentes

Situaciones novedosas inesperadas generan una respuesta orientadora en el sujeto que las percibe, se sugiere que esta respuesta juega un papel importante en algunas formas de memoria y aprendizaje. Esta respuesta orientadora captura la atención del sujeto involuntariamente hasta que se familiariza y se habitúa

(Yamaguchi, 2004). La detección de estos estímulos novedosos juega un papel crítico para evadir situaciones peligrosas y para adaptarse a los cambios ambientales. Un estímulo novedoso provoca una respuesta orientadora que se rechaza o se integra mientras el estímulo se vuelve familiar (Sokolov, 1963).

Cuando un animal es expuesto a un olor novedoso, se aproxima y lo investiga activamente. Con presentaciones repetidas del olor, el animal pasa progresivamente menos tiempo indagándolo (habituaación). Cuando se presenta otro olor que el animal percibe como diferente al anterior renueva su interés y lo investiga nuevamente (deshabituaación al estímulo anterior). Este nuevo interés por parte del animal demuestra que puede diferenciar ambos olores (Woodley y Baum, 2003). Esta prueba se ha utilizado satisfactoriamente en ratones (referencia de Gregg y thisen), pero no se había realizado en ratas, así el primer objeto fue la estandarización de la misma. Antes de realizar las pruebas de discriminación fue necesario determinar si los sujetos percibían los diferentes estímulos olfatorios en nuestras condiciones experimentales. Así en el primer experimento, en tres pruebas diferentes, determinamos si percibían los olores de machos sexualmente expertos, de hembras sexualmente receptivas y de hembras en anestro.

11.2 Sujetos

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (350 ± 50 gr.) que fueron mantenidos en un bioterio con ciclo de 12 hrs luz – 12 hrs oscuridad (las luces se encendieron a las 21:00 hrs) con acceso libre a agua y alimento (Lab Diet Feed PMI, USA. No. 5008). Se hicieron dos grupos experimentales: 1) Grupo de machos sexualmente expertos ($n = 9$): machos que eyacularon con hembras receptivas en tres pruebas consecutivas de cópula separadas por 2 días entre cada prueba. 2) Grupo de machos sexualmente inexpertos ($n = 8$): machos que nunca estuvieron en contacto con hembras sexualmente receptivas.

11.3 Procedimiento

Las pruebas de olores sexualmente relevantes se llevaron a cabo en una caja estándar de acrílico transparente (15 x 33 x 23 cm.) con la rejilla de alimento cubierta en la superficie posterior con una malla de acero de 2mm de luz. A continuación, 10 μ l del olor estímulo se vaciaron en un papel filtro colocado en la porción cóncava de un plato de plástico para pesar. Éste se colocó sobre la malla de acero de manera que la rata pudiera tener acceso a los olores volátiles de la orina pero no pudiera tocarla con las narinas ni con las vibrisas. La prueba se llevó a cabo con luz tenue para que los estímulos visuales no interfirieran con el experimento (Figura 5).

11.4 Prueba Olfatoria

Se colocó a los sujetos en la caja de prueba (ver figura 5). Se hicieron tres presentaciones del estímulo neutro seguidas de tres presentaciones del estímulo a valorar. Cada exposición del estímulo duró 2 minutos, con un minuto sin estímulo entre presentación y presentación. Durante la presentación del estímulo se contó el tiempo en el que el animal experimental olfateó el área correspondiente a la de la charola para pesar. Se evaluaron las diferencias dadas por el tiempo de olfacción entre la tercera presentación de agua y la primera del estímulo evaluado.



Fig.5 Se muestra a un macho ejecutando la prueba de habituación / discriminación de olores al momento de ejecutar la conducta de olfateo en el área estímulo.

11.5 Estadística

Se realizó un ANOVA de tres factores: Grupos (expertos vs inexpertos) estímulo (agua vs estímulo) y presentación (número de estímulo), para medidas repetidas en el factor presentación.

En caso de diferencias significativas, se realizaron pruebas post-hoc de Fisher's LSD.

11.6 Resultados.

11.6.1 Prueba 1. Percepción de orina de machos sexualmente expertos

Se evaluó si los sujetos experimentales fueron capaces de percibir el olor producido por la orina de otros machos sexualmente expertos con los parámetros ya descritos. Hubo un efecto significativo entre grupos ($F_{(1,16)} = 5.463$; $p = 0.033$). También entre los estímulos presentados ($F_{(1,16)} = 6.432$; $p = 0.022$) y entre presentaciones ($F_{(2,16)} = 24.364$; $p < 0.001$). Finalmente, también en la interacción entre grupos con el factor estímulo ($F = 4.891_{(1,16)}$; $p = 0.042$). Las pruebas *post hoc* demostraron que ambos grupos de machos, con experiencia sexual y sin ella, perciben el olor presentado ($p < 0.0001$). Además el grupo de machos inexpertos pasa más tiempo que los expertos olfateando la orina de machos sexualmente expertos ($p < 0.0001$) (Figura 6).

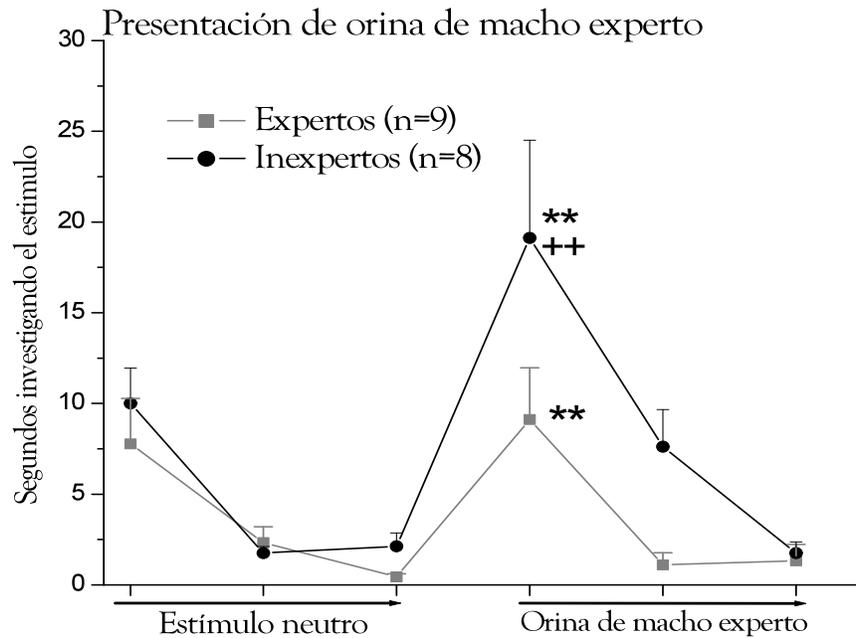


Figura 6. Muestra el tiempo que pasaron los dos grupos experimentales olfateando la orina de machos sexualmente expertos. **Diferencias entre la tercera presentación de agua y la primera del estímulo $p < 0.01$. ++Diferencias entre grupos en la cuarta presentación $p < 0.01$

11.6.2 Prueba 2. Percepción de orina de hembras en estro.

Usando una ANOVA se encontraron diferencias significativas entre presentaciones ($F_{(2,16)} = 18.083$; $p < 0.001$) ambos grupos experimentales percibieron el olor evaluado (Figura 7)

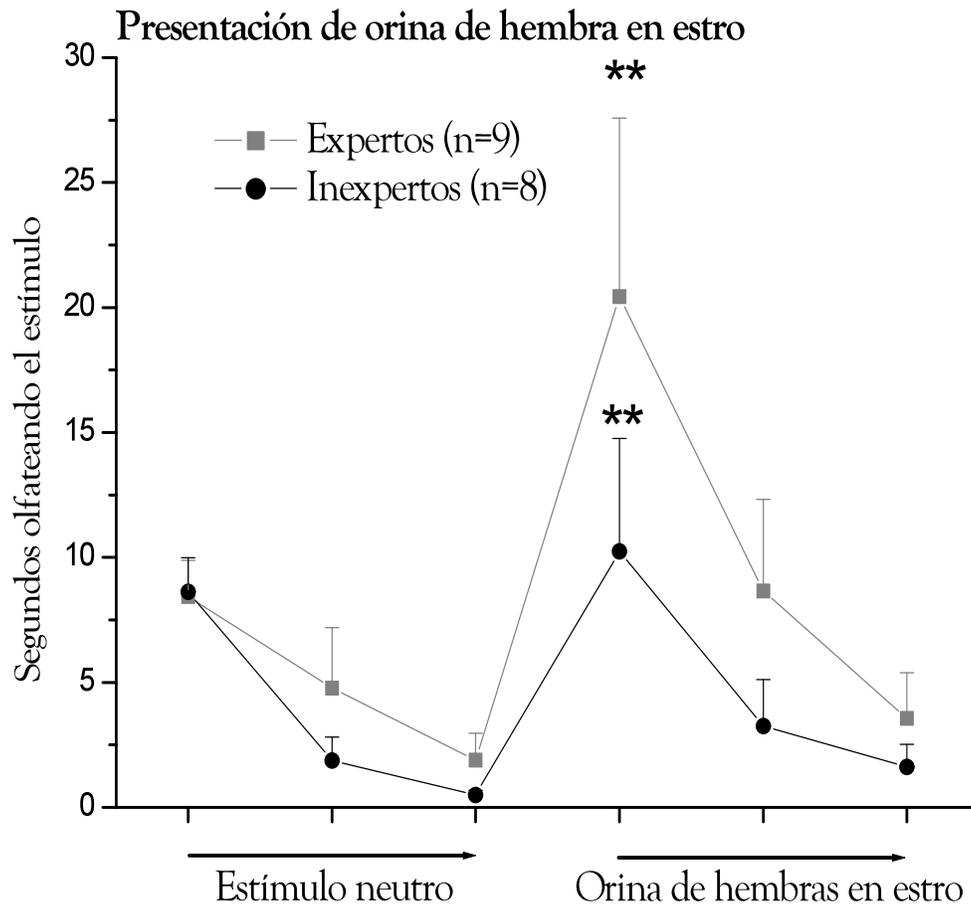


Figura 7. Tiempo que pasaron los dos grupos experimentales olfateando la orina de hembras en estro.

**Diferencias entre la tercera presentación de agua y la primera del estímulo $p < 0.01$

11.6.3 Prueba 3. Percepción de orina de hembras en anestro.

Hubo efectos significativos entre el factor estímulo ($F_{(1,16)} = 18.783$; $p = 0.0006$), el factor presentación ($F_{(2,16)} = 17.612$; $p < 0.001$) y en la interacción de los dos anteriores ($F_{(2,16)} = 5.489$; $p = 0.009$) (Figura 8).

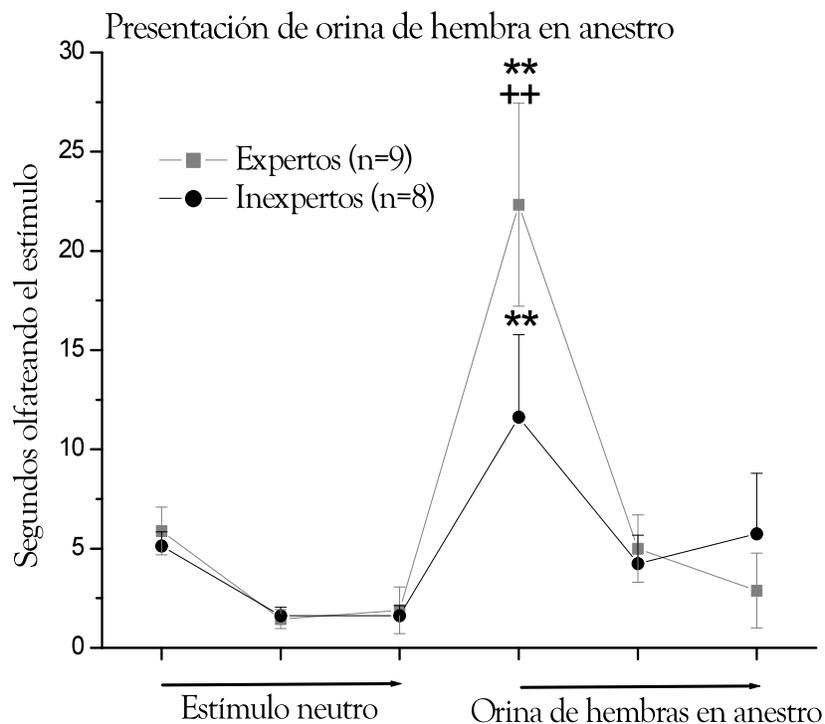


Figura 8. Tiempo que pasaron los dos grupos experimentales olfateando la orina de hembras en anestro. **Diferencias entre la tercera presentación de agua y la primera del estímulo $p < 0.01$. ++Diferencias entre los dos grupos en la cuarta presentación $p < 0.01$

11.6.4 Prueba 4. Percepción de olor control

Hubo diferencias significativas entre el factor estímulo ($F_{(1,16)} = 26.97$; $p = 0.0001$), el factor presentación ($F_{(2,16)} = 1336.025$; $p < 0.0001$) y en la interacción de los dos anteriores ($F = 21.321$ ($2,16$); $p < 0.0001$). Como se observa en la figura 9, ambos grupos percibieron el olor de jugo de manzana

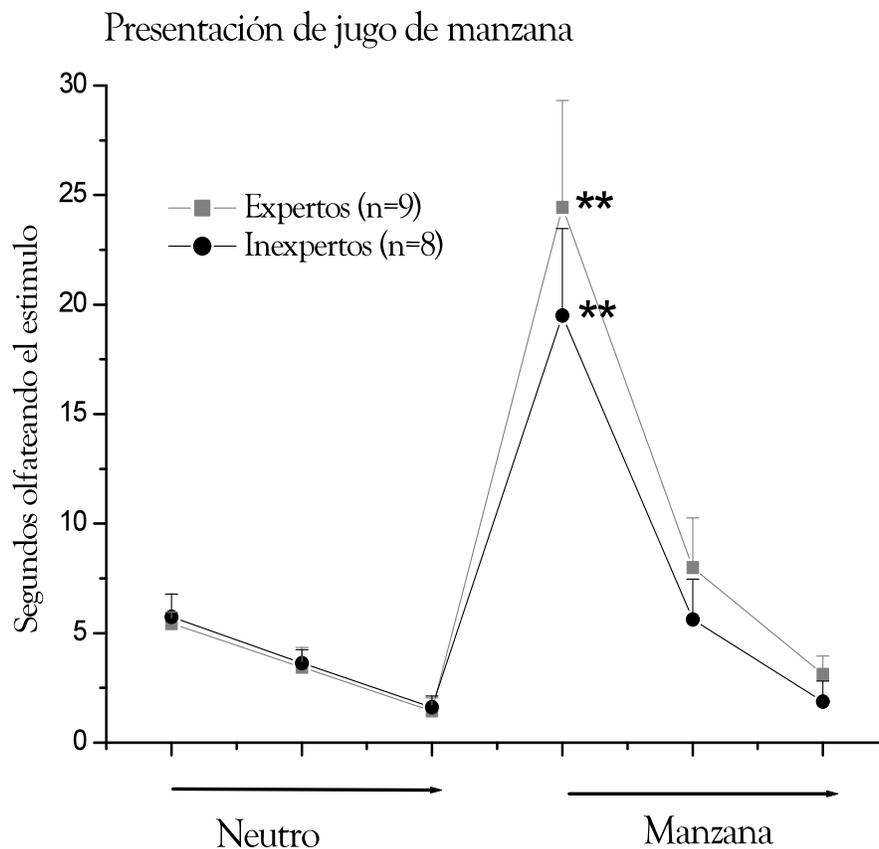


Figura 9. Muestra el tiempo que pasaron los dos grupos experimentales olfateando el olor de manzana.

****Diferencia de con respecto la tercera presentación de agua y la primera del estímulo $p < 0.01$**

11.7 Discusión

Como ya mencionamos en los antecedentes, la experiencia juega un papel muy importante en el procesamiento de las feromonas. Es importante recalcar que hay pocos trabajos que estudien con más detalle el papel de la experiencia sexual en el procesamiento de las feromonas y sus repercusiones fisiológicas. En nuestro trabajo se demuestra que la percepción de estímulos sexualmente relevantes no depende de la experiencia, dado que ambos grupos de machos (expertos e inexpertos) lograron percibir estas señales. Sin embargo, existen diferencias significativas en el tiempo de olfacción hacia los estímulos, como en el caso de la orina de hembras en estro y anestro vs la orina de machos sexualmente expertos. Moore & Wong (1996) demostraron que los olores secretados por hembras en estro no son aprendidos a lo largo de la vida de las ratas macho, es decir, que no dependen de la experiencia, sin embargo nuestros datos parecen contradecir lo que encontraron en sus experimentos. Para el olor de orina de hembras en anestro se encontraron diferencias en el tiempo de olfacción entre ambos grupos, donde los machos expertos olfatearon el estímulo más tiempo, esto puede deberse a que ciertas propiedades de estos olores son semejantes a los de hembras en estro, pero que hay alguna diferencia en ellos que requiere de una asociación con la cópula para que sean más relevantes en los machos con experiencia. Se sabe que la amígdala medial, el NLET y el APM/HA participan en este proceso y que según la experiencia sexual que tenga el sujeto, mayor es la activación de c-Fos en el APM/HA (Fewell y Meredith, 2002) ; (Hamer y *co/s.*, 1993). De igual manera el olor de orina de ratas macho sexualmente expertos tuvo una diferencia significativa entre ambos grupos, esto puede deberse a la novedad del estímulo, dado que los machos expertos están habituados a la orina de otros machos sexualmente activos mientras que los inexpertos no. Otra hipótesis que surge de estos datos es que, para los machos sexualmente inexpertos, la orina de otros machos sexualmente expertos es importante para el establecimiento de relaciones sociosexuales. Así mismo, ambos grupos fueron expuestos por primera vez al olor de manzana mostrando un tiempo de olfacción similar.

En conjunto los resultados del primer experimento nos indican que en las condiciones experimentales de nuestro laboratorio los sujetos perciben los diferentes olores que se usaron en las pruebas de discriminación.

12 Experimento 2 .

Pruebas de Discriminación de Olores Sexualmente

Relevantes

12.1 Antecedentes

El creciente desarrollo de técnicas para analizar olores de importancia social en mamíferos necesita la creación de nuevas pruebas conductuales donde las respuestas a estas señales químicas sean medidas confiablemente.

La mayoría de las pruebas de discriminación olfatoria se hacían con técnicas de condicionamiento operante, la ventaja de hacer condicionamientos es que la discriminación del animal experimental es clara, pero el proceso de condicionamiento en sí presenta una serie de desventajas, como son: 1) que el animal puede presentar dificultades para aprender la tarea. 2) es necesario equipo especializado 3) en la mayoría de los casos se requieren periodos de entrenamiento largos para obtener resultados consistentes. Por lo anterior, solo algunos animales son aptos para hacer la tarea de discriminación aún después del entrenamiento. Además es necesario mantener niveles significativos de motivación a lo largo del experimento por medio del acceso controlado al agua y a los alimentos, o los choques eléctricos que agregan variables no controladas a la prueba (Gregg y Thiessen, 1981). En el presente trabajo utilizamos una prueba de habituación / discriminación en que el animal responde olfateando más tiempo a un olor nuevo. Esta respuesta disminuye a medida que el animal se acostumbra a

este olor (habituaación) y aumenta de nuevo cuando percibe un olor distinto al primero (deshabituaación) (Gregg y Thiessen, 1981).

Para probar si la experiencia sexual es importante en la discriminación de olores sexualmente relevantes realizamos el experimento 2 (A). donde, siguiendo el mismo criterio que en el experimento anterior, se formaron dos grupos experimentales, uno de machos sexualmente expertos y otro de machos sexualmente inexpertos, solo que ahora se harán dos presentaciones de estímulos olfatorios seguidos de la habituaación al estímulo neutro. Mientras que para probar si el APM/HA es importante para regular la discriminación de olores sexualmente relevantes hicimos el experimento 2 (B) en el que, utilizando esta variante para evaluar la capacidad de discriminación entre dos olores similares, se formaron dos grupos: uno de machos sexualmente expertos con lesiones quimiotóxicas en al APM/HA y otro de machos sexualmente expertos con lesiones fuera del APM/HA. Mismos que fueron probados antes y después de las lesiones.

12.2 Sujetos

Para este experimento utilizamos ratas macho de la cepa Wistar (350 ± 50 gr.) mantenidos en un bioterio con ciclo de 12 hrs luz – 12 hrs oscuridad (las luces se encendieron a las 21:00 hrs) con acceso libre a agua y alimento (Lab Diet Feed PMI, USA. No. 5008). Se hicieron dos grupos experimentales: 1) Grupo de machos sexualmente expertos (n = 26): machos que eyacularon con hembras receptivas en tres pruebas consecutivas de cópula pero separadas por 2 días entre ellas. 2) Grupo de machos sexualmente inexpertos (n = 20): machos que nunca estuvieron en contacto con hembras receptivas.

12.3 Procedimiento:

Las pruebas de habituaación/discriminación se llevaron a cabo en la caja descrita en el experimento 1. La presentación de los estímulos fue igual que en la prueba anterior, solo que, en lugar de presentar un estímulo neutro y luego el estímulo

sexualmente relevante, presentamos el estímulo neutro, luego un estímulo olfatorio sexualmente relevante y luego un segundo estímulo sexualmente relevante distinto del primero, esto para determinar si el sujeto era capaz de discriminar un olor sexualmente relevante de otro. Es importante recalcar que las presentaciones de los estímulos se dieron de forma contrabalanceada, es decir, a la mitad de los sujetos se les evaluó el tiempo de olfacción del estímulo A seguido del estímulo B. A la otra mitad se les presentó primero el estímulo B seguido del A, evitando así que los datos obtenidos provinieran del orden de presentación y no del interés que mostraron hacia los estímulos. Esta prueba tampoco había sido realizada con ratas, así que procedimos a la estandarización de la misma. Los resultados concuerdan con los obtenidos usando este mismo método en ratones (Baum y Keverne, 2002).

12.4 Resultados.

12.4.1 Prueba 5. Discriminación de olor de orina de macho

sexualmente experto vs. Orina de hembra en estro.

No encontramos diferencias significativas en el factor grupo ($F_{(1,25)} = 0.004$; $p = .94$). Si existieron diferencias significativas en los factores olor ($F_{(1,25)} = 24.4$; $p < 0.0001$) presentación ($F_{(1,25)} = 77.7$; $p < 0.0001$) y en la interacción grupo y presentación ($F_{(1,25)} = 20.44$; $p < 0.0001$). Como puede observarse en la figura??? ambos grupos muestra un aumento en el tiempo oliendo la orina de macho con respecto a la segunda presentación de agua, posteriormente los animales se habitúan y cuando se presente la orina de hembra en estro el tiempo que pasan oliendo este estímulo aumenta significativamente.

Discriminación de orina de macho vs. hembra en estro.

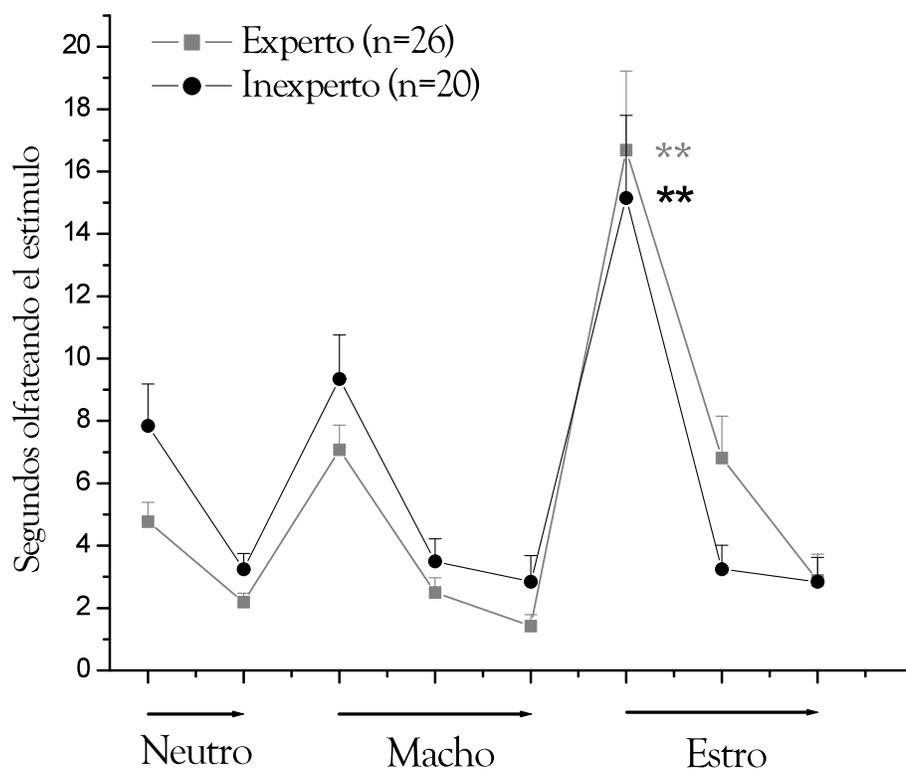


Figura 10. Se muestra la habituación de los grupos hacia la orina del machos expertos, y luego la deshabituación hacia la orina de hembras en estro. **Diferente de la presentación anterior. $p < 0.01$.

12.4.2 Prueba 6. Discriminación de olor de orina de hembra en anestro vs. hembra en estro.

No hubo diferencias significativas en el factor grupo ($F_{(1,25)} = 1.12$; $p = 0.29$) pero si en los factores olor ($F_{(1,25)} = 17.61$; $p = 0.0001$) presentación ($F_{(1,25)} = 108.79$; $p = 0.0001$) y en la interacción grupo y presentación ($F_{(1,25)} = 6.73$; $p = 0.0019$). Las pruebas post hoc indican nuevamente que tanto los sujetos sexualmente inexpertos como los expertos aumentan significativamente el tiempo que pasan oliendo la orina de hembras en anestro y en estro en comparación con el estímulo que los antecede (fig 11).

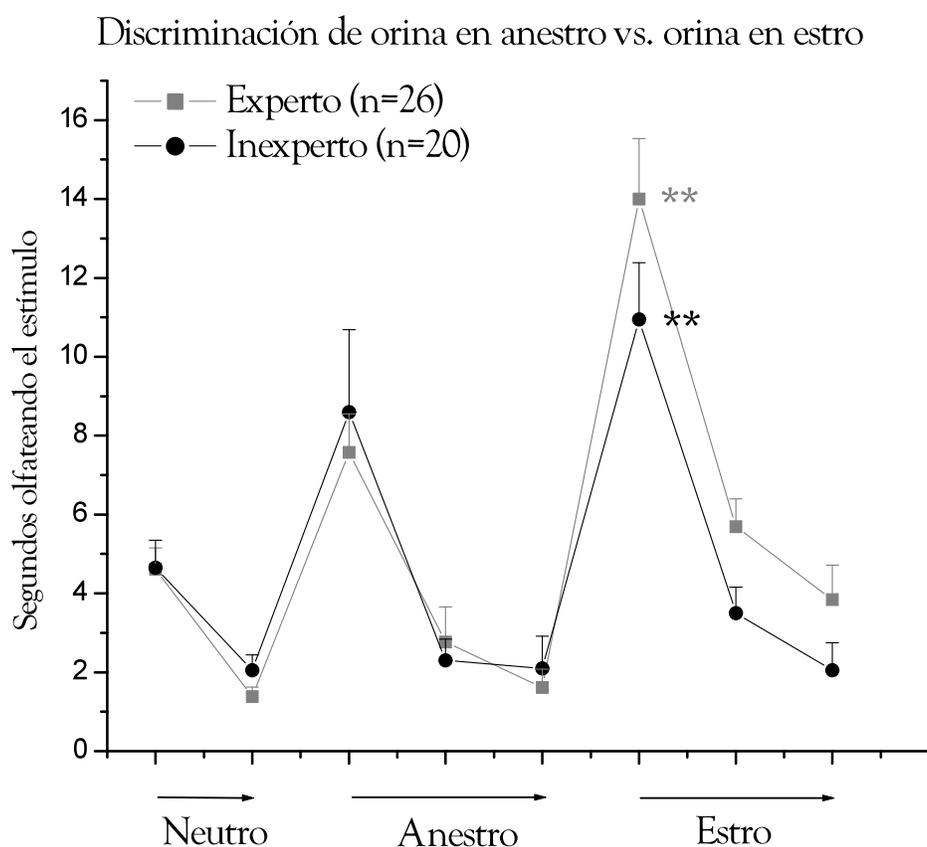


Figura 11. Se muestra la habituación de los grupos hacia la orina de hembras en anestro y luego la deshabituación hacia la orina de hembras en estro. ****Diferente de la presentación anterior $p < 0.01$.**

12.4.3 Prueba 7. Discriminación de Olores no Sexualmente Relevantes.

No encontramos diferencias estadísticamente significativas en el factor grupo ($F_{(1,25)} = 1.08$.; $p = 0.3$) pero si en los factores: olor ($F_{(1,25)} = 21.03$.; $p < 0.0001$) presentación ($F_{(1,25)} = 173.52$.; $p < 0.0001$) y en la interacción grupo y presentación ($F_{(1,25)} = 11.44$; $p < 0.0001$). Nuevamente, como se observa en la figura????, las pruebas posthoc demuestran que ambos grupos de animales discriminan claramente los olores de menta y plátano.

Discriminación de olores no sexualmente relevantes

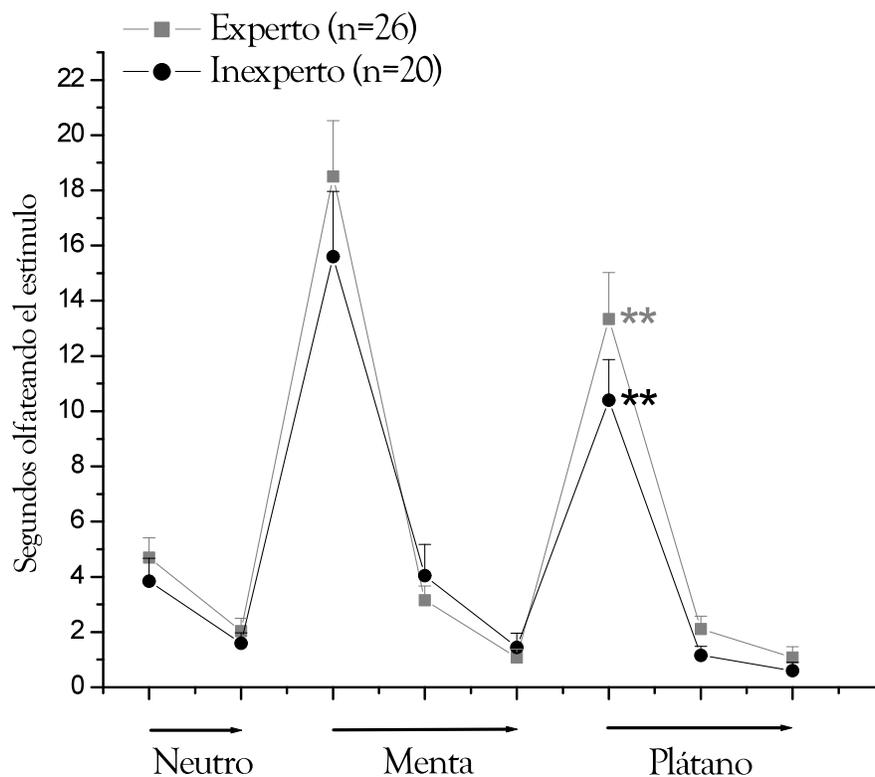


Figura 12. Se muestra la habituación de los grupos hacia el primer olor control (menta) y luego la deshabituación hacia el segundo olor control (acetato de amilo).
**Diferente de la presentación anterior $p < 0.01$.

12.5 **D**iscusión.

Nuestros resultados demuestran que ambos grupos lograron discriminar un olor de otro en todos los casos. Esto porque hubo diferencias significativas entre la última presentación del primer estímulo y la primera del segundo en los tiempos de olfacción. Lo que nos indica que la experiencia sexual no influye en la discriminación de olores sexualmente relevantes, sin embargo si influye en la motivación hacia la percepción de estímulos sexualmente relevantes (datos del experimento anterior). Contrario a lo que esperábamos, en este experimento no encontramos diferencias significativas entre grupos.

13 Experimento 2.B.

Para determinar el papel del APM/HA en la discriminación de olores sexualmente relevantes utilizamos un grupo de machos sexualmente expertos, mismos a los que evaluamos su capacidad de discriminación olfatoria utilizando el mismo procedimiento de habituación/discriminación de la prueba anterior, antes y después de una lesión quimiotóxica.

13.1 Sujetos

20 machos Wistar (350 ± 50 gr.) fueron mantenidos en un bioterio con ciclo invertido de 12 hrs luz – 12 hrs oscuridad (las luces se encendieron a las 21:00 hrs) con acceso libre a agua y alimento (Lab Diet Feed PMI, USA. No. 5008) fueron utilizados para hacer estas pruebas.

13.2 Cirugía:

Para la cirugía se llevó a cabo el procedimiento ya descrito en los métodos generales.

13.3 Procedimiento.

Las pruebas olfatorias fueron realizadas en las mismas condiciones descritas para el experimento 2A antes y después de la lesión.

13.4 Histología.

Una vez terminadas las pruebas post-lesión, los animales fueron anestesiados profundamente con pentobarbital y fueron perfundidos con solución salina al 0.9% seguida de una solución de paraformaldehído al 4%. Se hicieron cortes coronales de 40 μ m a la altura del APM/HA y se formaron tres series alternas para hacer inmunohistoquímica. Para determinar si el ácido quinolínico lesionó el área

preóptica realizamos una doble inmunohistoquímica (ver figura 13) contra GFAP (un marcador de glía) y Neu-N (un marcador de somas neuronales). Después de evaluar el sitio de lesión, formamos dos grupos experimentales: 1) Grupo de machos sexualmente expertos con lesión bilateral del APM/HA (n = 5). 2) Grupo de machos sexualmente expertos con lesión fuera o unilateral del APM/HA (n = 8). 7 sujetos no sobrevivieron a la cirugía.

13.5 Estadística.

Procedimos a hacer un ANOVA de tres vías (lesión, grupo y estímulo) y en caso de encontrar diferencias estadísticamente significativas se realizó una Newman Kuels como prueba posthoc.

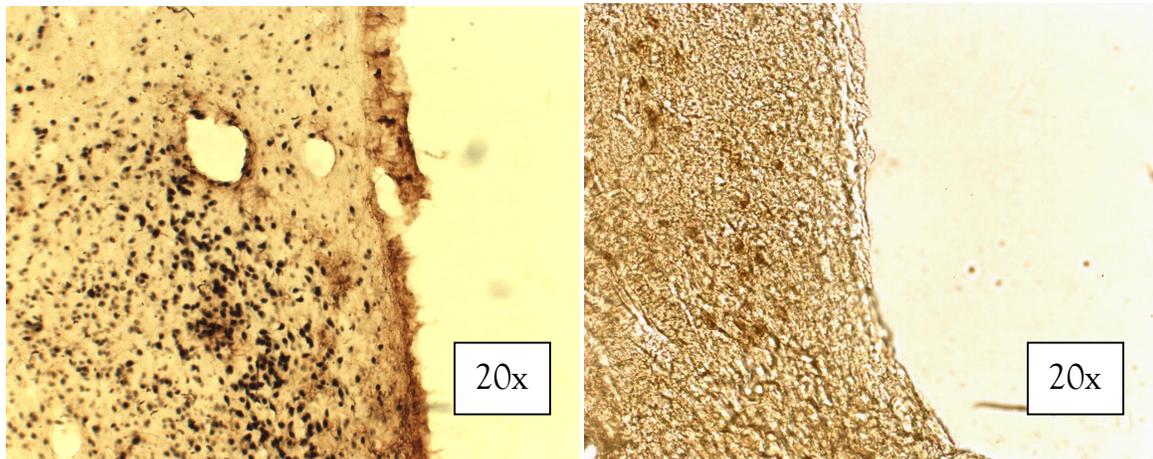


Figura 13. Cortes coronales donde se muestra una doble inmunohistoquímica contra GFAP y NeuN en el el APM/HA. En el panel A se muestra una lesión bilateral donde hay muy pocas células reactivas a NeuN y una gran cantidad de células marcadas con GFAP, lo que nos indica la muerte de las neuronas de la zona. En el panel B se muestra el corte de una r ata control, donde se ve una gran cantidad de células reactivas a NeuN y muy pocas reactivas a GFAP.

13.6 Resultados

13.6.1 Prueba 8: Discriminación de olor de orina de macho

sexualmente experto vs. hembra en estro.

Encontramos diferencias significativas en todos los factores: grupo ($F_{(1,4)} = 7.190.$; $p = 0.0279$), olor ($F_{(1,4)} = 4.822.$; $p = 0.0594$) presentación ($F_{(1,4)} = 10.306.$; $p = 0.0013$) y en la interacción grupo y presentación ($F_{(1,4)} = 7.832.$; $p = 0.0042$). Como se observa en las figuras 14 y 15 los animales con lesión en el APM no aumentan el tiempo olfateando el nuevo estímulo a diferencia de lo que ocurre antes de la lesión y en el grupo de animales con lesión fuera.

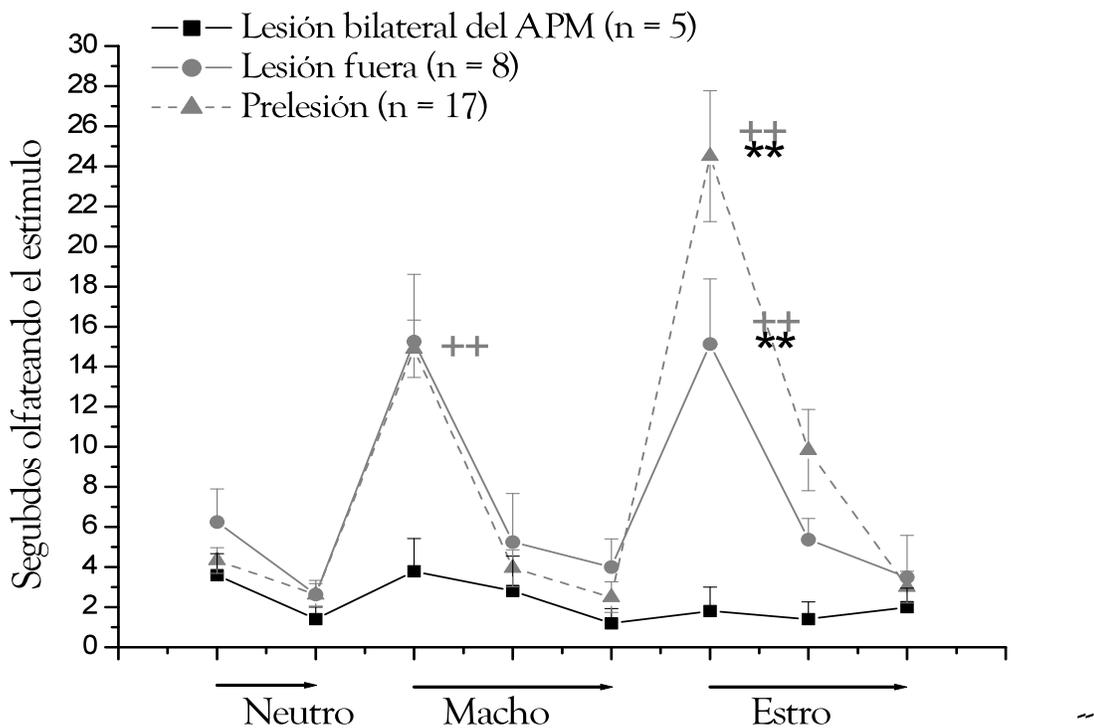


Figura 14. Se muestra la habituación de los tres grupos hacia la orina de otros machos sexualmente expertos y luego la deshabituación hacia la orina de hembras en estro. **Diferente de la presentación anterior $p < 0.01$. ++ Diferencia en la misma presentación después de la lesión $p < 0.01$

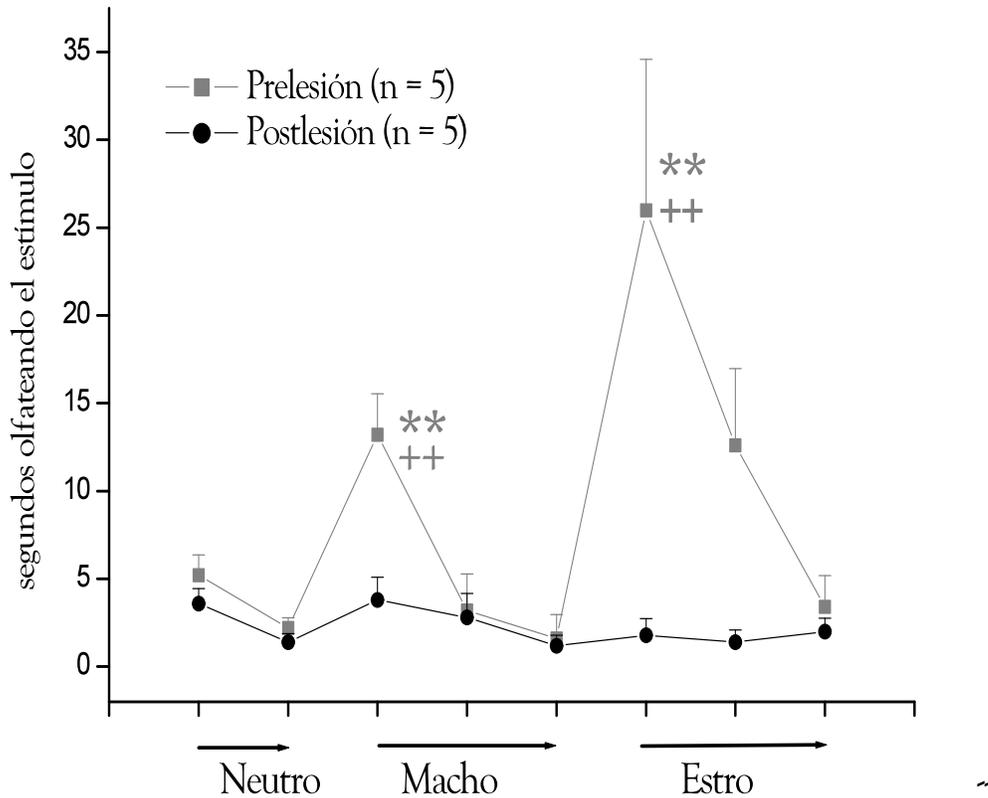


Figura 15. Se muestra la habituación de los grupos hacia la orina de otros machos sexualmente expertos y luego la deshabituación hacia la orina de hembras en estro. En gris se observa el grupo antes de la lesión y en negro los mismos animales después de la lesión. ** Diferente de la presentación anterior $p < 0.01$. ++ Diferencia en la misma presentación después de la lesión $p < 0.01$

13.6.2 Prueba 9: Discriminación de olor de orina de hembra en anestro vs. hembra en estro.

No encontramos diferencias estadísticamente significativas en los factores grupo ($F_{(1,4)} = ????.; p = ?????$), olor ($F_{(1,4)} = ?????; p = ?????$) y en la interacción grupo y presentación ($F_{(1,4)} = ??????; p = ?????$).

Hubo diferencias significativas en el factor presentación ($F_{(1,4)} = 0.; p < 0.0001$). Los análisis posthoc demostraron que el grupo con lesión en el APM no aumenta el tiempo oliendo la orina de hembra en estro como sucede antes de la lesión y en el grupo con lesión parcial (ver figura 16).

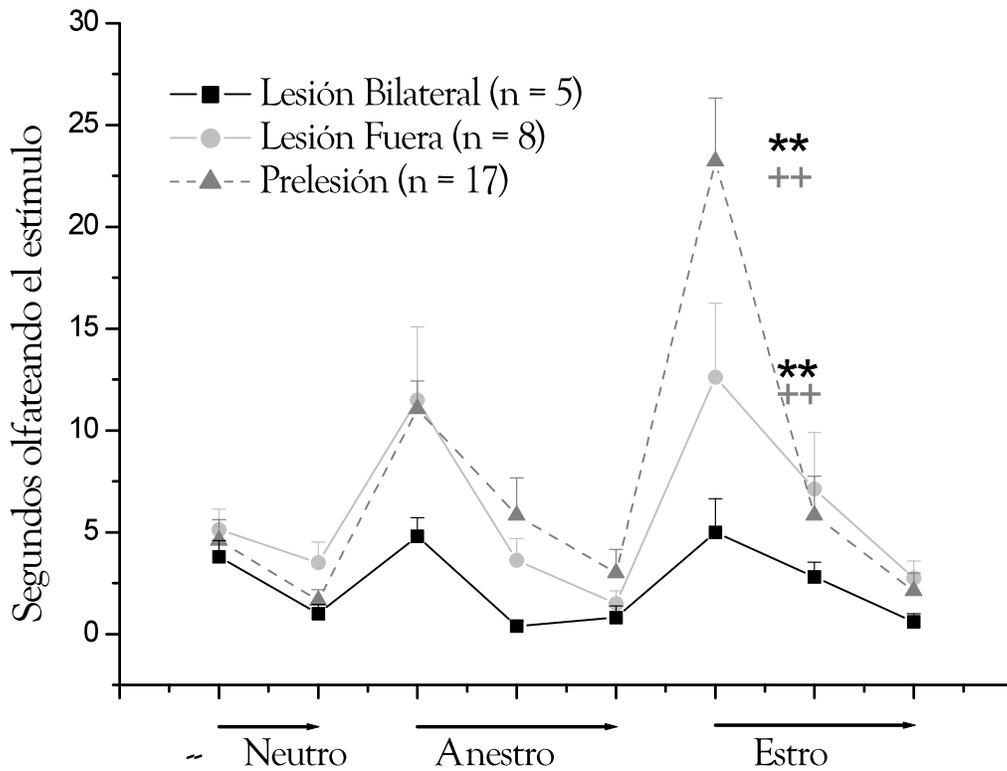


Figura 16. Se muestra la habituación de los tres grupos hacia la orina de hembras en estro y luego la deshabituación hacia la orina de hembras en estro. ** Diferente de la presentación anterior

$p < 0.01$. ++Diferente de la misma presentación después de la lesión $p < 0$.

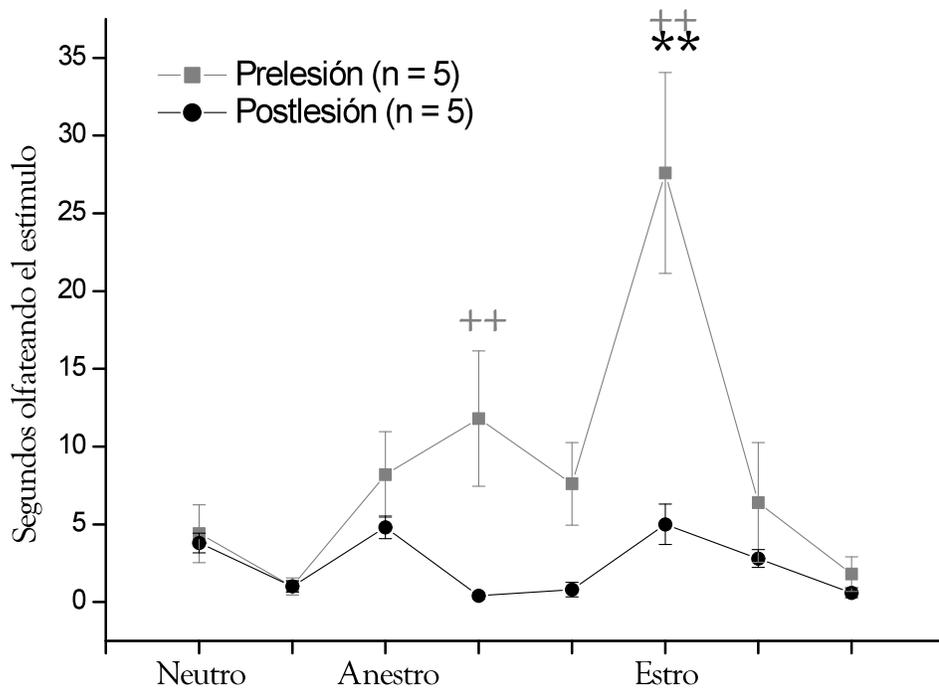


Figura 18. Se muestra la habituación de los grupos hacia la orina de hembras en anestro y luego la deshabituación hacia la orina de hembras en estro. En gris se observa el grupo antes de la lesión y en negro los mismos animales después de la lesión. ** Diferente de la presentación anterior $p < 0.01$. ++Diferente de la misma presentación después de la lesión $p < 0.01$

13.6.3 Prueba 10. Discriminación de Olores no Sexualmente Relevantes.

No encontramos diferencias estadísticamente significativas en los factores grupo ($F_{(1,4)} = ????$; $p = ?????$), y olor ($F_{(1,4)} = ????$; $p = ????$). Hubo diferencias significativas entre el factor presentación ($F_{(1,4)} = 36.963$; $p < 0.0001$) y en la interacción del factor grupo y el factor de olor ($F_{(1,4)} = 4.456$; $p = 0.0678$). Los análisis posthoc demostraron que el grupo de animales con lesión bilateral en el APM aumenta el tiempo oliendo la menta aunque huele el estímulo menos tiempo que antes de la lesión y menos que los animales con lesión parcial. Con respecto al olor de plátano los animales lo huelen el mismo tiempo que antes de la lesión y que los animales con lesión parcial (ver figura 19).

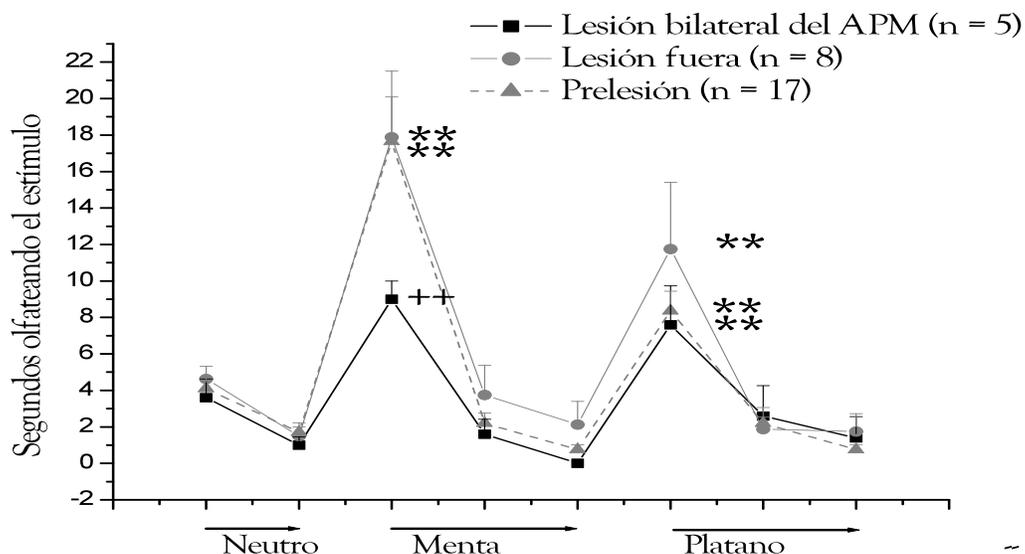


Figura 19 Se muestra la habituación de los tres grupos hacia el olor de menta y luego la deshabituación hacia el olor de acetato de amilo. ** Diferente de la presentación anterior

$p < 0.01$. ++Diferente de los otros grupos en la misma presentación $p < 0.01$

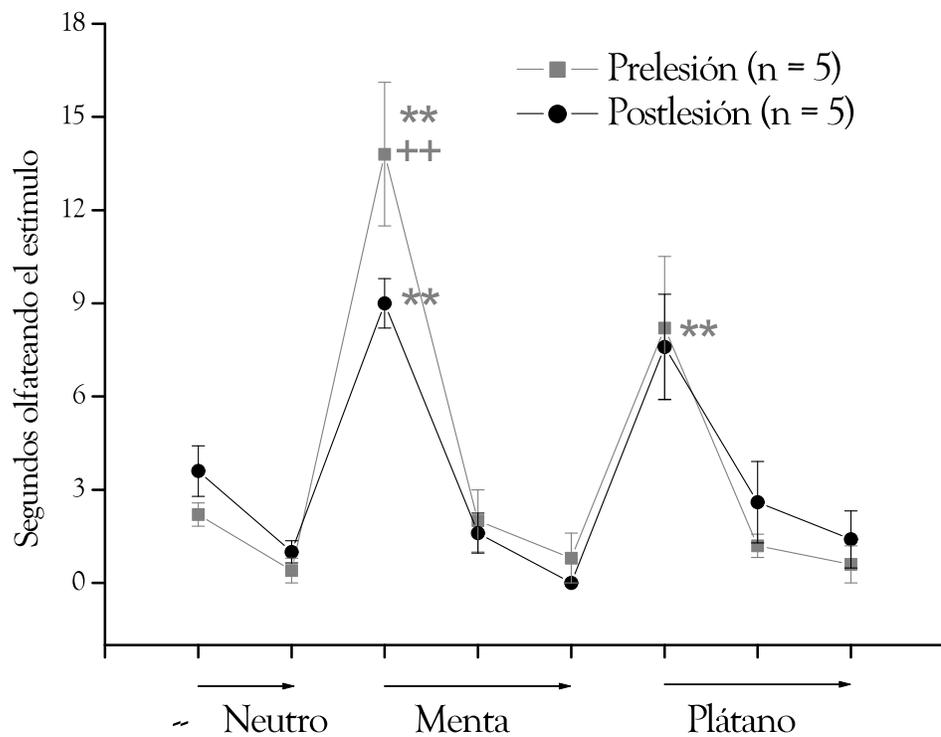


Figura 20. Se muestra la habituación de los grupos hacia el primer olor control (menta) y luego la deshabitación hacia el segundo olor control (acetato de amilo).

** Diferente de la presentación anterior $p < 0.01$. ++Diferente de la misma presentación después de la lesión $p < 0.01$

13.7 Discusión.

Cuando evaluamos los efectos de la lesión quimiotóxica del APM/HA en la discriminación de olores sexualmente relevantes los datos nos permiten sugerir que esta estructura es importante en el procesamiento de olores sexualmente relevantes. En las figura 14 y 15 se puede observar que la lesión inhibe por completo el acercamiento a las señales sexualmente relevantes (orina de hembra en estro, anestro y de machos sexualmente expertos), esto porque los animales que fueron lesionados bilateralmente, no tienen conducta de olfateo hacia los estímulos, existe una reducción notable del tiempo de olfacción. Sin embargo no parece tener influencia en los estímulos no sexualmente relevantes (fig 8) como la menta y el acetato de amilo, que son olores que corresponden a estímulos no relacionados a la motivación sexual. Esto se puede interpretar de dos maneras: la primera, que el APM/HA sea una estructura relacionada únicamente con la detección y discriminación olfatoria de estímulos sexualmente relevantes dado que forma parte del circuito olfatorio accesorio y por lo tanto, su lesión interfiera con el correcto procesamiento de feromonas. Se sabe que cuando alguno de los bulbos olfatorios es removido, los animales con experiencia sexual no dejan de copular, pero no se han descrito trabajos con la remoción completa de ambos bulbos olfatorios sin remover una parte de la corteza frontal o sin dejar fibras aferentes y eferentes de los bulbos (ver introducción), y que es probable que la remoción de ambos impida el inicio de la cópula tanto en machos expertos como en inexpertos. Si esto es así, entonces la abolición de la conducta sexual masculina, hablando en términos de “motivación” estará dada por el correcto procesamiento de las feromonas en los circuitos olfatorios. La segunda interpretación es que el APM/HA regule la motivación sexual masculina y al estar dañada las feromonas pierdan su

atractividad. Existen muy pocos trabajos que relacionen al APM/HA con la percepción y discriminación de estímulos olfatorios, estos resultados arrojan nuevos conocimientos que habrá que abordar de distintas maneras en futuras investigaciones.

14 Experimento 3. Motivación sexual incentiva.

14.1 Antecedentes

Esta prueba tiene como objetivo tratar de cuantificar el nivel de motivación de los individuos hacia un incentivo sexual. Además de tratar con estímulos olfatorios sexualmente relevantes se añaden estímulos auditivos y visuales pero, como ya se dijo anteriormente, se evitan los estímulos táctiles. Estas pruebas fueron realizadas conforme al procedimiento descrito por Agmo (2003).

14.2 Sujetos

Para el experimento 3.A. utilizamos a los mismos machos que en el experimento 1, y de igual manera, formamos dos grupos: 1) Grupo de machos sexualmente expertos (n = 9): machos que eyacularon con hembras receptivas en tres pruebas consecutivas de cópula pero separadas por 2 días entre ellas. 2) Grupo de machos sexualmente inexpertos (n = 8): machos que nunca estuvieron en contacto con hembras receptivas.

14.3 Procedimiento

Realizamos las pruebas en una arena rectangular de acrílico negro (100x50x50). En las paredes largas de la arena se hicieron aberturas, tapadas con malla de alambre, a las que se les ensambló una caja (15x25x25) dentro de la cuál se colocó al animal incentivo (una hembra en estro, anestro o macho sexualmente activo). Este procedimiento tiene la ventaja de que es posible cambiar aleatoriamente las cajas donde se encuentran los estímulos sin que las sustancias químicas secretadas por los animales estímulo se mezclen. Frente a las cajas de los animales estímulo se delimitó un área (20x30 cm.) llamada zona incentiva. Antes del experimento, los machos experimentales fueron habituados tres veces dentro de la caja durante diez minutos cada vez. Los animales fueron monitoreados a través de una cámara de video instalada en un programa de cómputo (Ethovision), mismo que calculó el tiempo que los animales estuvieron

dentro y fuera de las zonas incentivativas. Las pruebas fueron idénticas a la habituación con la diferencia de que los animales estímulo estaban dentro de las cajas intercambiables. Durante las pruebas, los machos experimentales pudieron oler, escuchar y ver a los animales estímulo, pero no tener contacto físico con ellos. Se cuantificó el tiempo que los animales experimentales pasaron en cada una de las zonas incentivativas. (Fig 21.)

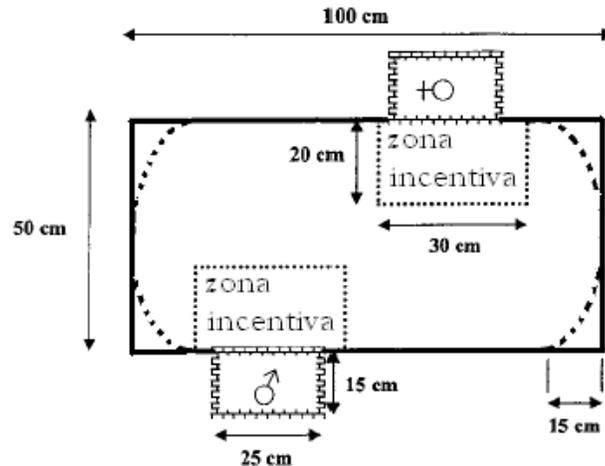


Fig 21. Esquema de la caja de motivación sexual incentivativa (modificada de Agmo 2003)

Para evaluar los efectos de la experiencia sexual en esta prueba de motivación incentivativa realizamos el experimento 3A, donde evaluamos el tiempo que los animales de dos grupos, uno de machos sexualmente expertos y otro de machos sexualmente inexpertos, pasaban en la zona incentivativa de los animales estímulos.

14.4 Resultados.

14.4.1 Prueba 11. Motivación Sexual Incentiva entre Machos Sexualmente Expertos vs. Hembras en Estro.

No hubo diferencias en ningún factor. Para el factor estímulo obtuvimos una $p = 0.787$ ($F_{(1,7)} = 0.075$) y en el factor "experiencia sexual" obtuvimos una probabilidad de 0.158 ($F_{(1,7)} = 2.206$).

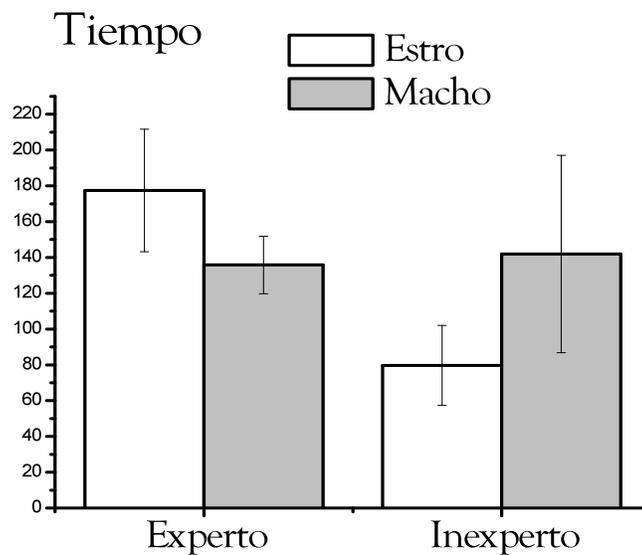


Figura 22 Tiempo que pasaron los animales estímulo en las zonas incentivadas de un macho experto y de una hembra en estro.

14.4.2 Prueba 12: Motivación Sexual Incentiva entre Hembras en Anestro vs. Hembras en Estro.

Hubo diferencias en la interacción de los grupos estímulo y “experiencia sexual” ($F_{(1,7)} = 4.601$; $p = 0.0487$). Pero no hubo diferencias cuando se realiza la prueba de Fisher LSD o la Newman Keuls.

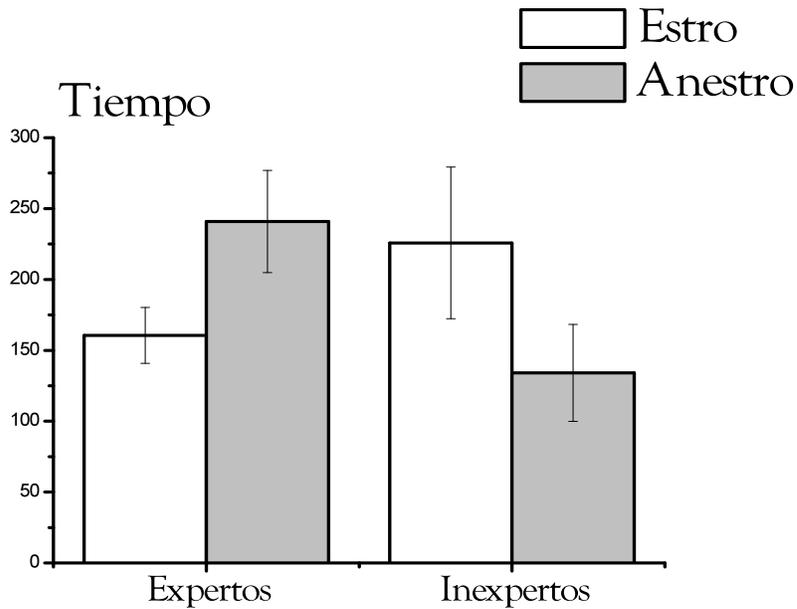


Figura 23. Tiempo que pasaron los animales estímulo en las zonas incentivadas de una hembra en anestro y de una hembra en estro.

14.5 Discusión.

La experiencia sexual también modifica la motivación hacia un incentivo sexual, ya que en la prueba donde se compara la atractividad hacia los incentivos de una hembra en estro contra los de un macho sexualmente experto, aunque no hubo diferencias significativas, se observa una clara tendencia de los inexpertos hacia los incentivos sexuales de otros machos sexualmente expertos, mientras que los machos sexualmente expertos prefieren los incentivos de las hembras en estro (gráfica 22). Cuando comparamos los incentivos sexuales de una hembra en estro contra los de una hembra en anestro (gráfica 23) se vuelven a observar cambios en las preferencias debidos a la experiencia sexual, donde los machos sexualmente expertos pasan igual tiempo con una hembra en estro que con una en anestro, mientras que los inexpertos prefieren los incentivos sexuales de hembras en estro sobre los incentivos de una hembra en anestro. Estos resultados son similares a los obtenidos en las pruebas de percepción de olores (experimento 1), donde los machos sexualmente expertos olfatean significativamente más tiempo los olores de orina de hembras en anestro que los machos sexualmente inexpertos, mientras que los machos sexualmente inexpertos prefieren los olores de orina de otros machos sexualmente activos.

15 Experimento 3.B

Para determinar los efectos de la lesión en el APM/HA en la atraktividad hacia los incentivos sexuales realizamos la misma prueba descrita en el experimento anterior pero usando los mismos sujetos del experimento 2.B. Como se describió anteriormente, se obtuvieron dos grupos experimentales 1) Machos con lesión bilateral del APM/HA (n = 5) 2) Machos con lesión fuera o unilateral del APM/HA (n = 8). La formación de grupos se realizó después de llevar a cabo la histología y determinar los sitios de la lesión.

15.1 Prueba 13: Motivación Sexual Incentiva entre Machos Sexualmente Expertos vs. Hembras en Estro.

Hubo diferencias significativas en los factores: grupo ($F_{(1,4)} = 12.15271$.; $p 0.0051$), lesión ($F_{(1,4)} = 17.70107$.; $p 0.0015$) en la interacción lesión y estímulo ($F_{(1,4)} = 8.33422$; $p 0.0148$). Como se observa en la figura 24 los animales con lesión bilateral del APM muestra una reducción significativa en el tiempo que pasan en la zona incentivativa de la hembra en estro después de la lesión mientras que los animales con lesión parcial pasan el mismo tiempos con ambos animales estímulo.

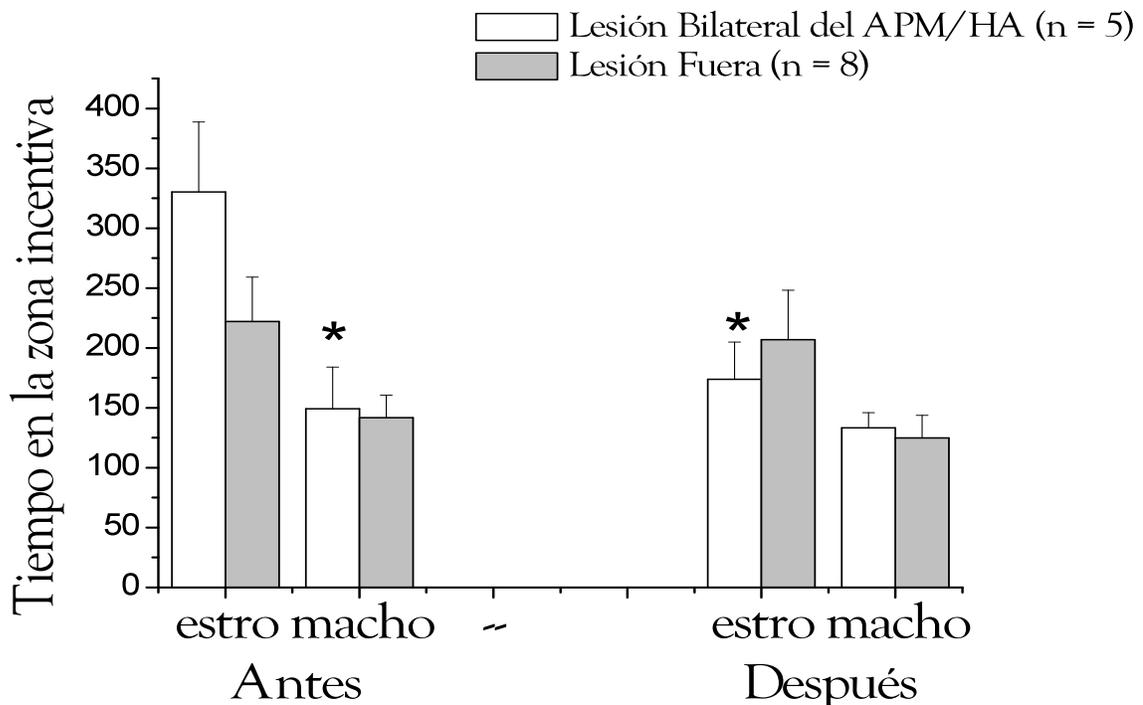


Figura 24. Muestra el tiempo que pasaron ambos grupos en las zonas incentivativas de hembras en estro y otros machos, antes y después de la lesión del APM/HA. * Diferente de estro antes de la lesión bilateral $p < 0.05$.

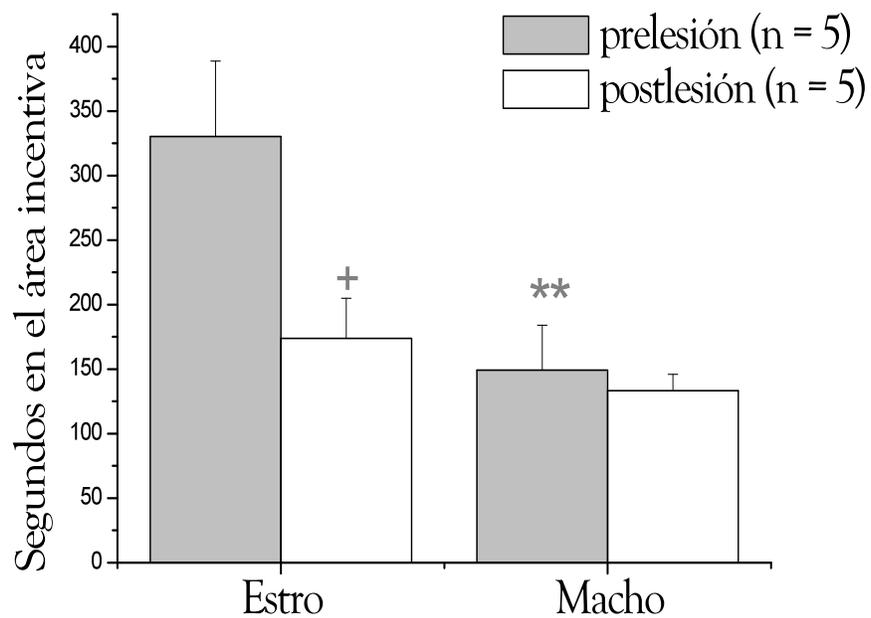


Figura 25. Tiempo que pasaron los animales experimentales con lesión bilateral en las zonas incentivas de un macho experto y de una hembra en estro.

**Diferencias entre el tiempo que pasan los machos antes de la lesión entre hembras en estro y otros machos $p < 0.01$. +Diferente de estro antes de la lesión la lesión bilateral $p < 0.05$

15.2 Prueba 14: Motivación Sexual Incentiva entre Hembras en Anestro vs. Hembras en Estro.

Hubo diferencias únicamente entre el factor lesión ($F_{(1,4)} = 51.97173$.; $p < 0.0001$).

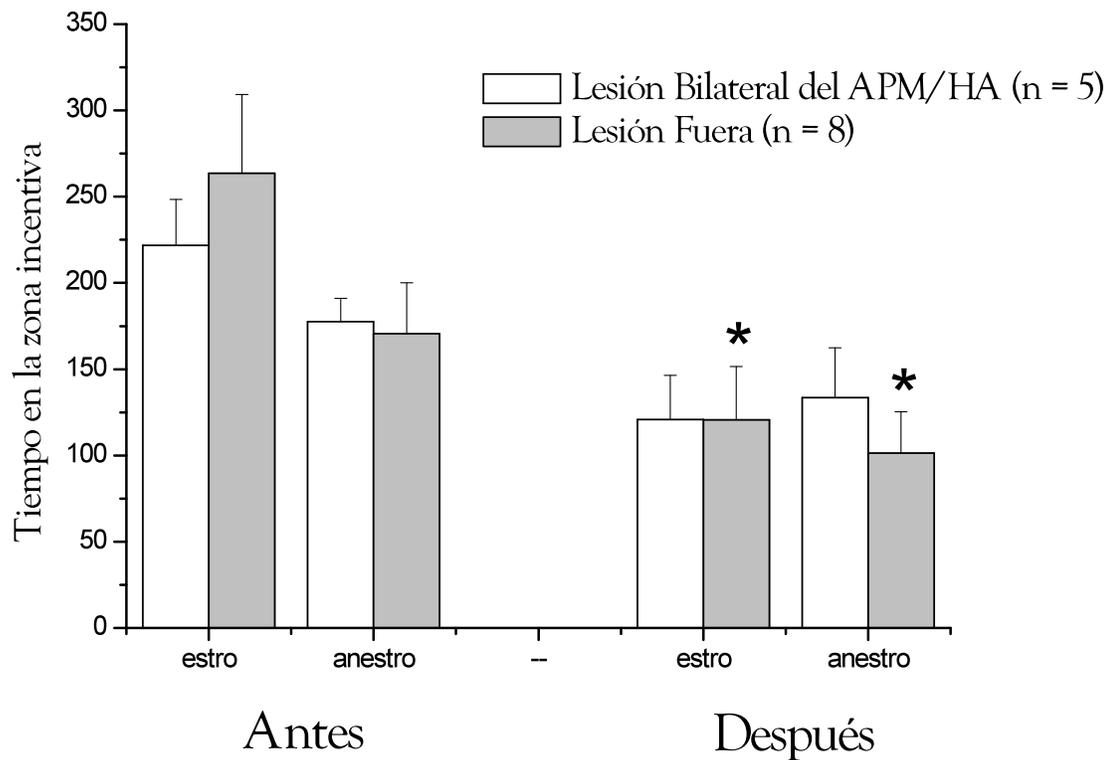


Figura 26: Muestra el tiempo que pasaron ambos grupos en las zonas incentivas de hembras en estro y en anestro antes y después de la lesión del APM/HA.

*Diferente del grupo con lesión fuera en estro antes de la lesión $p < 0.05$

Hubo diferencias significativas entre el factor lesión ($F_{(1,4)} = 12.59072$; $p = 0.0075$) y en la interacción del factor estímulo y el factor lesión ($F_{(1,4)} = 1.94508$; $p = 0.2006$)

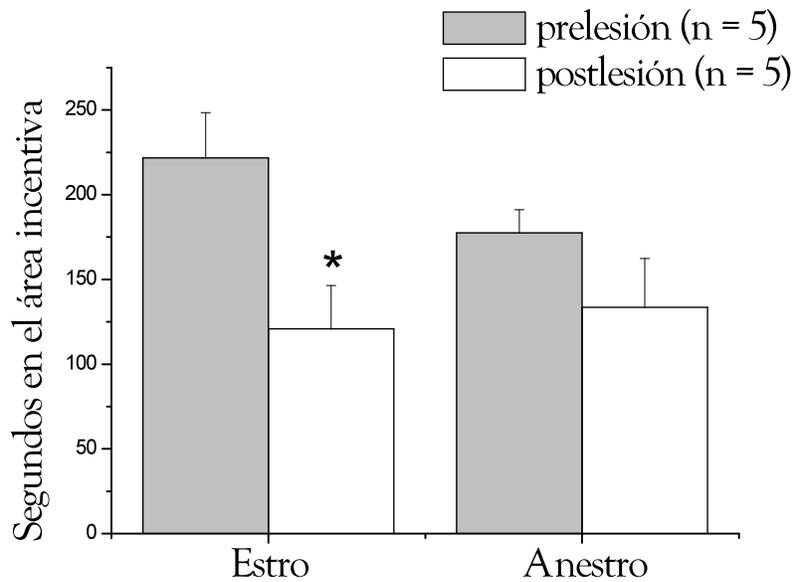


Figura 27. Tiempo que pasaron los animales estímulo en las zonas incentivas de una hembra en anestro y de una hembra en estro. *Diferente de estro antes de la lesión $p < 0.05$

15.3 Discusión.

Los efectos de la lesión del APM/HA en la preferencia hacia los incentivos sexuales son dramáticos. En una prueba de motivación donde los incentivos son: un macho sexualmente activo y una hembra en estro, los animales que presentaban una clara preferencia hacia la hembra antes de la lesión, pierden esta preferencia al realizar la prueba después de la lesión (gráfica 25). De alguna manera estos resultados se esperaban ya que, como se discutió en el experimento 2.B, el APM/HA puede estar jugando un papel muy importante en la motivación sexual, si esto es así, los incentivos sexuales pierden su atractividad al realizar la lesión del APM/HA. Como ya se menciona, otra posibilidad es que el APM/HA esté jugando un papel en el procesamiento de estímulos olfatorios y que al lesionar esta estructura, los animales no logren discriminar los incentivos sexuales de un macho y los de una hembra en estro (ver discusiones experimento 2B).

Cuando se prueban los incentivos sexuales de una hembra en estro contra los de una hembra en anestro (gráfica 15) los animales muestran un sesgo hacia los incentivos de una hembra en estro comparado contra los de una hembra en estro, este sesgo se invierte después de la lesión, sin embargo no existe una preferencia por un incentivo ni antes ni después de la lesión. Hay que tomar en cuenta que los sujetos experimentales tenían experiencia sexual y los datos que se obtienen antes de la lesión son similares a los de los sujetos con experiencia sexual del experimento 3.A.

16 Discusión General.

Los resultados de los experimentos realizados nos hacen sugerir que existe una participación de los dos sistemas olfatorios en el procesamiento de señales olfatorias sexualmente relevantes, esto porque los estímulos utilizados fueron de índole volátil, tradicionalmente, esto significaría que el sistema olfatorio accesorio no se ve involucrado. Sin embargo, el que la señal provenga de la mucosa olfatoria, que forma parte del sistema olfatorio principal y que finalmente, por medio de relevos en el BOP, AMG cortical y NLET, llegue la señal al APM/HA que forma parte de ambas vías olfatorias, nos hace sugerir la participación del sistema de proyección vomeronasal en el procesamiento de estas señales.

También podemos decir que la experiencia sexual juega un papel muy importante en la percepción de estímulos sexualmente relevantes y que, si bien no se sabe el porqué los machos inexpertos pasan más tiempo olfateando la orina de machos sexualmente activos, o que los machos sexualmente expertos prefieran la orina de hembras en anestro, es claro que afecta la motivación para olfatear selectivamente a los estímulos olfatorios sexualmente relevantes. También la experiencia sexual modula la motivación hacia los incentivos sexuales, así pues, será importante hacer un seguimiento más detallado sobre las implicaciones de esta experiencia en los sistemas olfatorios. Podrían evaluarse cambios plásticos asociado a la conducta sexual utilizando por inmunohistoquímicas contra GAP 43 y Sinaptofisina. Estas proteínas endógenas son marcadoras de plasticidad y podría compararse su expresión en diversos núcleos olfatorios de individuos con y sin experiencia sexual.

El APM/HA juega un papel muy importante en la discriminación de olores sexualmente reelevantes y en la atractividad hacia los incentivos sexuales. Sin embargo, falta descubrir si la pérdida del interés sexual hacia una potencial pareja se debe a la pérdida de la motivación sexual, que tradicionalmente se confiere a

esta estructura. Pero si esto se debe a la pérdida de discriminación olfatoria, habrá que reinterpretar los datos acumulados y sugerir nuevas estrategias para abordar el tema de la motivación sexual masculina.

EPÍLOGO

No sé. Hay gente que se muere y, con todos los respetos, no se pierde nada. Pero él era de los que, cuando ya no están, lo notas. Como si el mundo entero, de un día para otro, se hiciera un poco más pesado. A lo mejor este planeta, y todo lo que hay en él, flota en el aire sólo porque hay muchos Bartlebooms por ahí, ocupados en mantenerlo en su sitio. Con su ligereza. No tienen cara de héroe, pero mantienen el garito en marcha. Son así. Bartleboom era así. O sea: era capaz de cogerte por el brazo, un día cualquiera, por la calle, y decirte en gran secreto

-Una vez vi ángeles. Estaban en la orilla del mar.

A pesar de que él no creía en Dios, era un científico, y no mostraba gran predisposición por las cosas de la iglesia, no sé si me explico. Pero había visto ángeles. Y te lo decía. Te cogía del brazo, un día cualquiera, por la calle, y con la maravilla en los ojos te lo decía.

-Una vez vi ángeles.

¿Cómo no querer a alguien así?

Fragmento de *Océano mar*
Alessandro Baricco

17 Bibliografía

Adamek GD, Shipley MT, Sanders MS (1984) The indusium griseum in the mouse: architecture, Timm's histochemistry and some afferent connections. *Brain Res Bull* 12:657-668.

Agmo A (2002) Copulation-contingent aversive conditioning and sexual incentive motivation in male rats: evidence for a two-stage process of sexual behavior. *Physiol Behav* 77:425-435.

Agmo A (2003) Unconditioned sexual incentive motivation in the male Norway rat (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol* 117:3-14.

Allison A (1953) The morphology of the olfactory system in the vertebrates. *Biol Rev* 28:195-244.

Anderson EE (1936) Consistency of test of copulatory frequency in the male albino rat. *J Comp Psychol* 21:447-459.

Astic L, Saucier D (1986) Anatomical mapping of the neuroepithelial projection to the olfactory bulb in the rat. *Brain Res Bull* 16:445-454.

Balthazart J, Surlemont C (1990) Copulatory behavior is controlled by the sexually dimorphic nucleus of the quail POA. *Brain Res Bull* 25:7-14.

Balthazart J, Foidart A, Hendrick JC (1990) The induction by testosterone of aromatase activity in the preoptic area and activation of copulatory behavior. *Physiol Behav* 47:83-94.

Barros DM, Izquierdo LA, Medina JH, Izquierdo I (2003) Pharmacological findings contribute to the understanding of the main physiological mechanisms of memory retrieval. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2:81-94.

Baum MJ, Keverne EB (2002) Sex difference in attraction thresholds for volatile odors from male and estrous female mouse urine. *Horm Behav* 41:213-219.

Benjamin RM, Jackson, J. C., Golden, G. T. & West C. H. K. (1982) Sources of olfactory inputs to opossum mediodorsal nucleus identified by horseradish peroxidase and autodiographic methods. *J Comp Neurol* 207:358-368.

- Bermant GT, L. (1969) Interactive effects of experience and olfactory bulb lesions in male rat copulation. *Physiol Behav* 4:13-17.
- Binns KE, Brennan PA (2005) Changes in electrophysiological activity in the accessory olfactory bulb and medial amygdala associated with mate recognition in mice. *Eur J Neurosci* 21:2529-2537.
- Brookhart JM, Dey FL (1941) Reduction of sexual behavior in male guinea pigs by hypothalamic lesions. *American Journal of Physiology* 133:551-554.
- Chiba T, Murata Y (1985) Afferent and efferent connections of the medial preoptic area in the rat: a WGA-HRP study. *Brain Res Bull* 14:261-272.
- Claro F, Segovia S, Guilamon A, Del Abril A (1995) Lesions in the medial posterior region of the BST impair sexual behavior in sexually experienced and inexperienced male rats. *Brain Res Bull* 36:1-10.
- Conrad LC, Pfaff DW (1976) Efferents from medial basal forebrain and hypothalamus in the rat. I. An autoradiographic study of the medial preoptic area. *J Comp Neurol* 169:185-219.
- Cooke BM, Tabibnia G, Breedlove SM (1999) A brain sexual dimorphism controlled by adult circulating androgens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7538-7540.
- Cooke BM, Breedlove SM, Jordan CL (2003) Both estrogen receptors and androgen receptors contribute to testosterone-induced changes in the morphology of the medial amygdala and sexual arousal in male rats. *Horm Behav* 43:336-346.
- de Olmos J, Hardy H, Heimer L (1978) The afferent connections of the main and the accessory olfactory bulb formations in the rat: an experimental HRP-study. *J Comp Neurol* 181:213-244.
- Dominguez J, Riolo JV, Xu Z, Hull EM (2001) Regulation by the medial amygdala of copulation and medial preoptic dopamine release. *J Neurosci* 21:349-355.
- Dominguez-Salazar E, Portillo W, Velazquez-Moctezuma J, Paredes RG (2003) Facilitation of male-like coital behavior in female rats by kindling. *Behav Brain Res* 140:57-64.
- Dominguez-Salazar E, Portillo W, Baum MJ, Bakker J, Paredes RG (2002) Effect of prenatal androgen receptor antagonist or aromatase inhibitor on sexual behavior, partner preference and neuronal Fos responses to estrous female odors in the rat accessory olfactory system. *Physiol Behav* 75:337-346.
- Dulac C (2000) Sensory coding of pheromone signals in mammals. *Curr Opin Neurobiol* 10:511-518.

- Edwards DA (1974) Non-sensory involvement of the olfactory bulbs in the mediation of social behaviors. *Behav Biol* 11:287-302.
- Edwards DA, Griffis, K. T., Tardivel, C. (1990) Olfactory bulb removal: effects on sexual behavior and partner preference in male rats. *Physiol Behav* 48:447-450.
- Emery DE, Sachs, B. D. (1976) Copulatory behavior in male rats with lesions in the nucleus of the stria terminalis. *Physiol Behav* 17:803-806.
- Fewell GD, Meredith M (2002) Experience facilitates vomeronasal and olfactory influence on Fos expression in medial preoptic area during pheromone exposure or mating in male hamsters. *Brain Res* 941:91-106.
- Fleming A, Vaccarino, F., Tamboso, L., Chee, Ph. (1979) Vomeronasal and olfactory system modulation of maternal behavior in rat. *Science* 203:372-374.
- Haberly LB, Price JL (1978a) Association and commissural fiber systems of the olfactory cortex of the rat. II. Systems originating in the olfactory peduncle. *J Comp Neurol* 181:781-807.
- Haberly LB, Price JL (1978b) Association and commissural fiber systems of the olfactory cortex of the rat. *J Comp Neurol* 178:711-740.
- Hamer DH, Hu S, Magnuson VL, Hu N, Pattatucci AM (1993) A linkage between DNA markers on the X chromosome and male sexual orientation. *Science* 261:321-327.
- Hansen S, Kohler C, Goldstein M, Steinbusch HV (1982) Effects of ibotenic acid-induced neuronal degeneration in the medial preoptic area and the lateral hypothalamic area on sexual behavior in the male rat. *Brain Res* 239:213-232.
- Harris VS, Sachs BD (1975) Copulatory behavior in male rats following amygdaloid lesions. *Brain Res* 86:514-518.
- Heimer L, Larsson K (1966/1967) Impairment of mating behavior in male rats following lesions in the preoptic-anterior hypothalamic continuum. *Brain Research* 3:248-263.
- Hillarp NA, Olivercrona H, Silfverskiold W (1954) Evidence for the participation of the preoptic area in male mating behavior. *Experientia (Basel)* 10:224-225.
- Hlinak Z (1986) Precopulatory behavior of laboratory rat: an ethological approach. *Activ Nerv Sup.* 28:108-116.
- Hlinak Z (1990) Precopulatory behavior of male rats: developmental aspects and dependence on females solicitation. *Activ Nerv Sup.* 32:264-282.

Hlinak Z, Madlafousek, J. & Spinka, M. (1987) Transition from precopulatory to copulatory behavior in male rats with lesions in medial preoptic area: dependence on precopulatory pattern of male. *Activ Nerv Sup.* 29:257-262.

Hoffman GE, Smith MS, Verbalis JG (1993) c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 14:173-213.

Hurtazo HA (2000) Análisis de la preferencia olfatoria y el condicionamiento de lugar en ratas macho con lesiones en el área preóptica media del hipotálamo anterior (APM/HA). In: Instituto de Neurobiología, p 98. Querétaro, Qro., México: Universidad Nacional Autónoma de México.

Hurtazo HA, Agmo A, Paredes R (2004) Infusions of lidocaine in the medial preoptic area interrupts male sexual behavior in copulating rats. In: Society for Behavioral Neuroendocrinology. Lisbon, Portugal.

Johnston RE (1998) Pheromones, the vomeronasal system, and communication. From hormonal responses to individual recognition. *Ann N Y Acad Sci* 855:333-348.

Johnston RE, Peng M (2000) The vomeronasal organ is involved in discrimination of individual odors by males but not by females in golden hamsters. *Physiol Behav* 70:537-549.

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

Knutson B, Burgdorf J, Panksepp J (2002) Ultrasonic vocalizations as indices of affective states in rats. *Psychol Bull* 128:961-977.

Kondo Y, Sachs BD (2002) Disparate effects of small medial amygdala lesions on noncontact erection, copulation, and partner preference. *Physiol Behav* 76:443-447.

Kondo Y, Tomihara K, Sakuma Y (1999) Sensory requirements for noncontact penile erection in the rat. *Behav Neurosci* 113:1062-1070.

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

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

Larsson K (1975) Sexual impairment of inexperienced male rats following pre- and postpuberal olfactory bulbectomy. *Physiol Behav* 14:195-199.

- Larsson K (1979) Features of neuroendocrine regulation of masculine sexual behavior. In: *Endocrine Control of Sexual Behavior* (Beyer C, ed), pp 77-163, 477-497. N. Y.: Raven Press.
- Lisk RD (1968) Copulatory activity of the male rat following placement of preoptic-anterior hypothalamic lesions. *Exp Brain Res* 5:306-313.
- Liu YC, Salamone JD, Sachs BD (1997) Lesions in medial preoptic area and bed nucleus of stria terminalis: differential effects on copulatory behavior and noncontact erection in male rats. *J Neurosci* 17:5245-5253.
- Lupo C, Dessi-Fulgheri F, Musi B, Larsson K (1983) The effect of medial preoptic-anterior hypothalamic lesions on testosterone plasma levels and testosterone conversion in the hypothalamus of male rats. *Neuroscience Letters* 39:261-265.
- Luskin MB, Price JL (1983a) The laminar distribution of intracortical fibers originating in the olfactory cortex of the rat. *J Comp Neurol* 216:292-302.
- Luskin MB, Price JL (1983b) The topographic organization of associational fibers of the olfactory system in the rat, including centrifugal fibers to the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 216:264-291.
- McLean JH, Shipley MT (1987) Serotonergic afferents to the rat olfactory bulb: I. Origins and laminar specificity of serotonergic inputs in the adult rat. *J Neurosci* 7:3016-3028.
- McLean JH, Darby-King A, Sullivan RM, King SR (1993) Serotonergic influence on olfactory learning in the neonate rat. *Behav Neural Biol* 60:152-162.
- Meisel RL, Sachs BD (1994) The physiology of male sexual behavior. In: *The physiology of reproduction*, 2nd. Edition Edition (Knobil E, Neill JD, eds), pp 3-105. New York: Raven Press.
- Meisel RL, Lumia, A. R., Sachs, B. D. (1980) Effects of olfactory bulb removal and flank shock on copulation in male rats. *Physiol Behav*.
- Meredith M (1986) Vomeronasal organ removal before sexual experience impairs male hamster mating behavior. *Physiol Behav* 36:737-743.
- Meredith M (1998) Vomeronasal, olfactory, hormonal convergence in the brain. Cooperation or coincidence? *Ann N Y Acad Sci* 855:349-361.
- Meredith M (2001) Human vomeronasal organ function: a critical review of best and worst cases. *Chem Senses* 26:433-445.
- Meredith MA (2002) On the neuronal basis for multisensory convergence: a brief overview. *Brain Res Cogn Brain Res* 14:31-40.

Moncho-Bogani J, Martinez-Garcia F, Novejarque A, Lanuza E (2005) Attraction to sexual pheromones and associated odorants in female mice involves activation of the reward system and basolateral amygdala. *Eur J Neurosci* 21:2186-2198.

Moncho-Bogani J, Lanuza E, Hernandez A, Novejarque A, Martinez-Garcia F (2002) Attractive properties of sexual pheromones in mice: innate or learned? *Physiol Behav* 77:167-176.

Moore CL, Jordan L, Wong L (1996) Early olfactory experience, novelty, and choice of sexual partner by male rats. *Physiol Behav* 60:1361-1367.

Paredes R, Agmo A (1989) Stereospecific actions of baclofen on sociosexual behavior, locomotor activity and motor execution. *Psychopharmacology (Berl)* 97:358-364.

Paredes R, Haller AE, Manero MC, Alvarado R, Agmo A (1990a) Medial preoptic area kindling induces sexual behavior in sexually inactive male rats. *Brain Res* 515:20-26.

Paredes RG, Agmo A (1992) Facilitation of sexual behavior shortly after electrolytic lesion of the medial preoptic area: what does it mean? *Brain Res Bull* 29:125-128.

Paredes RG, Baum MJ (1997) Role of the medial preoptic area/anterior hypothalamus in the control of masculine sexual behavior. *Annu Rev Sex Res* 8:68-101.

Paredes RG, Highland L, Karam P (1993) Socio-sexual behavior in male rats after lesions of the medial preoptic area: evidence for reduced sexual motivation. *Brain Res* 618:271-276.

Paredes RG, Tzschentke T, Nakach N (1998) Lesions of the medial preoptic area/anterior hypothalamus (MPOA/AH) modify partner preference in male rats. *Brain Res* 813:1-8.

Paredes RG, Pina AL, Fernandez-Ruiz J, Bermudez-Rattoni F (1990b) Fetal brain transplants induce recovery of male sexual behavior in medial preoptic area-lesioned rats. *Brain Research* 523:331-336.

Paredes RG, Manero MC, Haller AE, Alvarado R, Agmo A (1992) Sexual behavior enhances postictal behavioral depression in kindled rats: opioid involvement. *Behav Brain Res* 52:175-182.

Paxinos G (2004) *The rat nervous system, Third Edition*. Sydney, Australia: Prince of Wales Medical Research Institute, The University of New South Wales.

Paxinos G, Watson C (1997) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York.: Academic Press.

- Pfaff DWK, M. (1973) Atlas of estradiol concentrating cells in central nervous system of the female rat. *J Comp Neurol* 151:121-158.
- Pollak EI, Sachs BD (1975) Excitatory and inhibitory effects of stimulation applied during the postejaculatory interval of the male rat. *Behav Biol* 15:449-461.
- Pomerantz SM, Clemens LG (1981) Ultrasonic vocalizations in male deer mice (*Peromyscus maniculatus bairdi*): their role in male sexual behavior. *Physiol Behav* 27:869-872.
- Portillo W, Paredes RG (2003) Sexual and olfactory preference in noncopulating male rats. *Physiol Behav* 80:155-162.
- Portillo W, Paredes RG (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* 43:330-340.
- Portillo W, Diaz NF, Cabrera EA, Fernandez-Guasti A, Paredes RG (2006) Comparative analysis of immunoreactive cells for androgen receptors and oestrogen receptor alpha in copulating and non-copulating male rats. *J Neuroendocrinol* 18:168-176.
- Romero PR, Beltramino CA, Carrer HF (1990) Participation of the olfactory system in the control of approach behavior of the female rat to the male. *Physiol Behav* 47:685-690.
- Roos J, Roos M, Schaeffer C, Aron C (1988) Sexual differences in the development of accessory olfactory bulbs in the rat. *J Comp Neurol* 270:121-131.
- Sachs BD, Akasofu K, Citron JH, Daniels SB, Natoli JH (1994) Noncontact stimulation from estrous females evokes penile erection in rats. *Physiol Behav* 55:1073-1079.
- Saito TR, Moltz H (1986) Copulatory behavior of sexually naive and sexually experienced male rats following removal of the vomeronasal organ. *Physiol Behav* 37:507-510.
- Saito TR, Mennella JA (1986) A simple operation method on removal of the vomeronasal organ of the rat. *Jikken Dobutsu* 35:527-529.
- Scalia F, Winans SS (1975) The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J Comp Neurol* 161:31-55.
- Segovia S, Guillamon A (1982) Effects of sex steroids on the development of the vomeronasal organ in the rat. *Brain Res* 281:209-212.

Segovia S, Guillaumon A (1996) Searching for sex differences in the vomeronasal pathway. *Horm Behav* 30:618-626.

Shipley MT, Adamek GD (1984) The connections of the mouse olfactory bulb: a study using orthograde and retrograde transport of wheat germ agglutinin conjugated to horseradish peroxidase. *Brain Res Bull* 12:669-688.

Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I (1997a) Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 388:507-525.

Shughrue PJ, Lubahn DB, Negro-Vilar A, Korach KS, Merchenthaler I (1997b) Responses in the brain of estrogen receptor alpha-disrupted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:11008-11012.

Simerly RB, Swanson LW (1986) The organization of neural inputs to the medial preoptic nucleus of the rat. *J Comp Neurol* 246:312-342.

Simerly RB, Chang C, Muramatsu M, Swanson LW (1990) Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 294:76-95.

Singer AG, Agosta WC, Clancy AN, Macrides F (1987) The chemistry of vomeronasally detected pheromones: characterization of an aphrodisiac protein. *Ann N Y Acad Sci* 519:287-298.

Sokolov EN (1963) [the Orienting Reflex as a Cybernetic System.]. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* 13:816-830.

Soulariac A, Soulariac ML (1956) Effects of hypothalamic lesions on sexual behavior and reproductive tract of the male rat. *Annals of Endocrinology (Paris)* 17.

Stumpf WE, Sar M, Clark SA, DeLuca HF (1982) Brain target sites for 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Science* 215:1403-1405.

Szechtman H, Caggiula AR, Wulkan D (1978) Preoptic knife cuts and sexual behavior in male rats. *Brain Res* 150:569-595.

Toates FM (1981) The control of ingestive behaviour by internal and external stimuli--a theoretical review. *Appetite* 2:35-50.

Winans SS, Powers JB (1977) Olfactory and vomeronasal deafferentation of male hamsters: histological and behavioral analyses. *Brain Res* 126:325-344.

Wintink AJ, Young NA, Davis AC, Gregus A, Kalynchuk LE (2003) Kindling-induced emotional behavior in male and female rats. *Behav Neurosci* 117:632-640.

Woodley SK, Baum MJ (2003) Effects of sex hormones and gender on attraction thresholds for volatile anal scent gland odors in ferrets. *Horm Behav* 44:110-118.

Xu F, Schaefer M, Kida I, Schafer J, Liu N, Rothman DL, Hyder F, Restrepo D, Shepherd GM (2005) Simultaneous activation of mouse main and accessory olfactory bulbs by odors or pheromones. *J Comp Neurol* 489:491-500.

Yamaguchi S (2004) Neural network for novelty processing. *Suppl Clin Neurophysiol* 57:635-641.

Zufall F, Leinders-Zufall T (2000) The cellular and molecular basis of odor adaptation. *Chem Senses* 25:473-481.