



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

LA NALOXONA BLOQUEA LA NEUROGÉNESIS INDUCIDA POR LA CÓPULA REGULADA
EN EL BULBO OLFATORIO DE LA RATA HEMBRA

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
(NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA:
LIC. MARIANELA SANTOYO ZEDILLO

TUTOR
DR. RAÚL GERARDO PAREDES GUERRERO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR
DRA. MARÍA MAGDALENA GIORDANO NOYOLA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM
DR. FERNANDO PEÑA ORTEGA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

MÉXICO AGOSTO DE 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Resumen

Estudios previos de nuestro laboratorio, han demostrado que la cópula regulada (CR) induce un estado afectivo positivo dependiente de opioides. También se demostró que la CR aumenta la neurogénesis (NG) en la capa granular del bulbo olfatorio accesorio (BOA).

En el presente trabajo, se estudió si la administración de naloxona (NX, antagonista opioide) bloquea la NG inducida por la estimulación sexual regulada. Se utilizaron ratas hembra (*Wistar*), sexualmente inexpertas, ovariectomizadas, tratadas hormonalmente e inyectadas con el marcador de síntesis de ADN 5-bromo-2'-deoxiuridina y se asignaron a un grupo: 1) control tratado con salina, 2) control tratado con NX, 3) hembras que no regularon la cópula, 4) hembras tratadas con solución salina antes de regular la cópula y 5) hembras tratadas con NX antes de regular la cópula. Quince días después de la prueba conductual, se obtuvieron sus tejidos cerebrales y se realizó inmunohistoquímica (IH) para detectar BrdU, así como inmunofluorescencia (IF) para detectar BrdU, NeuN (marcador nuclear neuronal) o GFAP (marcador de proteína ácida fribrilar glial).

Los datos muestran un incremento en el número de células inmunorreactivas a BrdU así como doble marcaje con BrdU y NeuN en las hembras que regularon la cópula tratadas previamente con salina en comparación con los demás grupos.

Nuestros datos demuestran que los péptidos opioides, tienen un papel fundamental en la neurogénesis del BO inducida por la CR. Posteriormente, serán necesarias nuevas investigaciones para determinar el papel de estas células nuevas en el sistema olfativo y en la fisiología de la reproducción.

Summary

Previous research from our group, demonstrated that when female rats are allowed to pace the sexual interaction (pacing) they develop a positive affective (reward) state, evaluated by the conditioned place preference paradigm (CPP). This reward state is mediated by opioids because the administration of naloxone (NX, opioid receptor antagonist) blocks the change of preference induced by pacing. Moreover, pacing increases neurogenesis in the accessory olfactory bulb (AOB).

In the present study we evaluated if the administration of NX could reduce neurogenesis in the AOB generated during the first session of paced sexual contacts. Sexually-naïve female rats, bilaterally ovariectomized, hormonally supplemented and treated with BrdU (DNA synthesis marker) were assigned to independent groups: 1) without sexual contact injected with saline, 2) without sexual contact injected with NX, 3) females that mated without pacing the sexual interaction, 4) females injected with saline before pacing the sexual interaction and 5) females injected with NX before paced mating.

An increase in the number of newborn cells, thus BrdU immunoreactive (BrdU IR) and an increase in double labeled cells BrdU IR and NeuN IR (nuclear neuronal marker) in the AOB of the females treated with saline that paced the sexual interaction was clearly observed when compared to the other groups.

These data support that opioid peptides have a fundamental role in the neurogenesis of the olfactory bulb induced by pacing in the female rat. Further research will need to determine the role of these newborn cells in the physiology of olfactory systems and reproduction.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México:

Por ser mi alma máter desde mis estudios preparatorios, licenciatura y ahora maestría, especialmente al Instituto de Neurobiología; su cuerpo académico y administrativo.

A las instituciones que otorgaron el financiamiento económico:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; por la beca otorgada con el Becario No: 550609 y la Beca Mixta: 123456 y el apoyo del proyecto CONACYT 167101. Asimismo los apoyos PAPIIT IN200512 y IN210215.

A los integrantes del Laboratorio de Conducta Sexual y Plasticidad:

En primer lugar al Dr. Raúl Paredes Guerrero, por dejarme ser parte de su grupo de trabajo, consejos y guía, además por su buen humor, pasión por la ciencia y alto sentido social. A la Dra. Wendy Portillo Martínez por su tutoría, enseñanzas y amistad a lo largo de este proyecto. A mis compañeros de laboratorio por sus enseñanzas, buen humor y compañía (Edwards, Gina, Marie, Lucía, Eli, Reynaldo, Pau, Min, Melani, Tania, Rebeca, Julián, Alan, Monserrat, Alejandra, Luis, Joseline, Fernanda, Liz). Al MVZ Francisco Javier Camacho Barrios y Felipe Ortiz por su asistencia técnica.

A los miembros de mi Comité Tutorial:

Por sus enseñanzas y motivación a la excelencia; Dra. Magda Giordano y Dr. Fernando Peña.

A los miembros de mi Jurado:

Dra. Tere Morales, Dr. Martínez de la Escalera, Dr. Fernández Guasti y Dra. Giordano, por sus valiosas aportaciones a este trabajo así como por ser excelentes profesores durante mis estudios.

Al personal del Instituto:

En primer lugar a la M. en C. Leonor Casanova Rico, por su gran paciencia y sabiduría en el cuidado de las generaciones y alumnos. A Lupita Amador Uribe y Carmelita Mendoza López por sus servicios en ventanillas, su paciencia y actitud de servicio. También al personal técnico del bioterio por su gran apoyo, consejos y labor desempeñada; al MVZ Martín García Servín y a la Dra. Alejandra Castilla León, a la técnica académica Elsa Nydia Hernández Ríos, por su consejo técnico en el área de microscopía, a los miembros de la unidad de cómputo; Ing. Ramón Martínez Olvera, ISC. Omar Hernández, M. en C. Alberto Lara e Ing. Sandra Hernández por su apoyo en el área de cómputo, así como a otros miembros de la comunidad, Lic. Nora, Sr. Sergio, Sra. Juana y Gabriel.

A los alumnos del Instituto:

A mis compañeros de generación de Maestría por los desvelos, clases, prácticas, salidas y grupos de estudio.

A los alumnos del programa de Doctorado, quienes tuvieron siempre una actitud de ayuda y gusto por compartir conocimientos.

Especialmente, gracias a Arturo, con quien compartí casa estos tres años, vimos entrar y salir a mucha gente y juntos formamos una linda comuna (Rebe, Aline, Pablo, Pau, Mildred, Mar, Alex, Mariana, Liz).

Dedicatoria

Dedico esta tesis de Maestría en primer lugar a mi familia. A mis padres, Marianela y Guillermo, quienes han sido un gran ejemplo de dedicación y esfuerzo ante las metas de la vida, por su amor y apoyo incondicional ante mis aventuras, por su gran cariño y comprensión, por los consejos, por las risas, por los momentos únicos, por ser la base que me trajo hasta aquí. A mis hermanos, por ser mi inspiración, ejemplo y apoyo aún en la lejanía. También a Alejandro muchas gracias por ser mi unidad desde hace ya algunos años siempre en las buenas y en las malas. Y a Ilse, quien desde la Facultad ha creído tanto como yo en mis sueños.

De manera muy especial, quiero mencionar a dos personas, que partieron de este mundo dejando una gran huella en mi corazón. A Héctor Santoyo Reyes, quien desde pequeña me hizo preguntarme la génesis de la mente más allá de los límites de la ciencia. Tu partida al inicio de esta Maestría, me ha hecho llenar mi ciencia ficción con tus latidos de pasión por la psicología, la ciencia y la filosofía. Aún no sé qué esa cosa que llamamos mente, pero continuaré buscándola con el rigor científico que me enseñaste y ahora por los dos dentro de esta cosa que llamamos cerebro. A Israela Balderas Moreno, quien me contagió su pasión por las Neurociencias y tuvo la paciencia de sentar las bases de la científica que quiero ser. Espero que estés en un lugar mejor.

Finalmente, a todos aquellos que han creído y creen en la ciencia como un motor que hará de este mundo un mundo mejor.

Índice

Resumen español	i
Resumen inglés	ii
Introducción	1
1. Antecedentes	
1.1 Conducta sexual de la rata hembra	2
1.1.1 Cópula regulada	2
1.2 Neurogénesis	5
1.2.1 Sistemas olfativos	7
1.2.2 Neurogénesis en el bulbo olfatorio	11
1.3.Opioides	14
1.3.1 Péptidos opioides	14
1.3.2 Receptores para opioides	15
1.3.3 Fármacos agonistas y antagonistas de receptores para opioides	16
1.3.4 Naloxona	16
1.3.5 Blancos moleculares de la naloxona	18
1.3.6 Opioides y neurogénesis	21
1.3.7 Opioides y conducta sexual	22
2. Trabajo de investigación	
2.1 Planteamiento del problema	24
2.2 Justificación	24
2.3 Pregunta de investigación	24
2.4 Hipótesis	25
2.5 Objetivo general	25
2.6 Objetivos específicos	25
2.7 Sujetos, materiales y métodos	
2.7.1 Animales	25
2.7.2 Materiales (fármacos y hormonas)	26
2.7.3 Métodos	27
2.7.3.1 Pruebas de conducta sexual	27
2.7.3.2 Inmunohistoquímica para BrdU	28
2.7.3.3 Inmunofluorescencia para BrdU/NeuN/GFAP	30

3. Resultados

3.1 Parámetros de conducta sexual	34
3.2 Cuantificación de células inmunorreactivas a BrdU en el bulbo olfatorio accesorio	35
3.3 Cuantificación de células inmunorreactivas a BrdU en el bulbo olfatorio principal	36
3.4 Cuantificación de células inmunoreactivas a BrdU, GFAP y NeuN en en el bulbo olfatorio accesorio	37
3.5 Cuantificación de diferenciación a fenotipo neuronal o glial	38

4. Discusión

4.1 Relación de la neurogénesis en el bulbo olfatorio y el sistema opioide	40
4.2 Comparación entre la cópula regulada y otras manipulaciones experimentales que favorecen la neurogénesis	44
4.3 La importancia de la neurogénesis en el bulbo olfatorio	46

5. Conclusiones	49
6. Perspectivas	49
7. Referencias	51
8. Lista de figuras	66
9. Lista de tablas	69

Introducción

La conducta sexual es el conjunto de comportamientos que van desde el cortejo hasta la cópula que dan como resultado la reproducción sexual, en la cual dos individuos de la misma especie combinan su material genético para dar lugar a un nuevo individuo (Kent, 2000; Thorpe et al., 2009). Ese conjunto de comportamientos son el resultado de la activación de circuitos neuronales que han sido objeto de estudio desde diversas aproximaciones para dar cuenta de sus bases neurobiológicas (Georgiadis et al., 2012). Nuestro grupo de trabajo se ha enfocado en estudiar los aspectos motivacionales de la conducta sexual, las estructuras que la regulan y los cambios plásticos en el sistema nervioso central que permiten la modificación de ésta como consecuencia de la experiencia. Así uno de los descubrimientos de nuestro grupo fue la propuesta de que los opioides modulan los estados afectivos positivos, que se generan por la cópula regulada (CR) (Martínez et al., 2001).

Por otro lado, también nuestro laboratorio fue el primero en demostrar que tras la CR, ocurren cambios plásticos como la neurogénesis (NG) que consiste en la generación e incorporación de nuevas neuronas en los circuitos preexistentes del bulbo olfatorio (BO) (Corona et al., 2011; Arzate et al., 2013). Sin embargo, es poco lo que se sabe acerca de los factores asociados a la conducta sexual con la NG en el BO.

Por lo anterior, en este trabajo se evaluó la participación de los péptidos opioides como un factor que modula la incorporación de células nuevas al BO de la rata hembra tras la CR.

1. Antecedentes

1.1 Conducta sexual en la rata hembra

Para este trabajo, es de especial interés la conducta de la hembra en la etapa de estro, durante la cual la rata hembra despliega una serie de patrones típicos que facilitan la reproducción sexual. Existen dos componentes principales en el despliegue de la conducta sexual de la rata hembra: el receptivo y el proceptivo (Beach, 1976). Por un lado, la receptividad es el resultado de una serie de cambios endocrinos que son regulados por el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, y está relacionada con el reflejo de lordosis. En este reflejo la hembra presenta una dorsiflexión de la columna vertebral, extiende sus patas traseras y deja expuesta el área genital para permitir la intromisión del pene del macho (Pfaus et al., 1999). Por otro lado, la proceptividad está definida por la presencia de conductas típicas de la especie denominadas de solicitud y son desplegadas para atraer al macho y facilitar la monta, intromisión y eyaculación y están altamente relacionadas con aspectos motivacionales. Estas conductas incluyen brincos, carreras en zig zag, movimiento de las orejas y vocalizaciones ultrasónicas (Beach, 1976).

1.1.1 Cópula regulada

Los aspectos básicos de la conducta sexual han sido estudiados en condiciones seminaturales teniendo como característica principal, el papel dominante del macho sobre la hembra en la regulación de la cantidad de estimulación sexual (McClintock et al., 1978). Una de las primeras aproximaciones experimentales en el estudio de la conducta sexual femenina y la determinación de los componentes de la conducta sexual, fue descrita por Pierce y Nutall (1961), quienes idearon un aparato que permitía el escape de la hembra tras la estimulación recibida por el macho. Los resultados que observaron fueron periodos de resistencia de la hembra hacia el macho y esto los llevó a plantear la posibilidad de que las hembras en estro controlan los contactos sexuales mediante la posibilidad de tener acceso al macho o a escapar de él. En estas condiciones las hembras mostraron una consistencia en la ejecución de la conducta a

lo largo del experimento tanto para aproximarse al macho como para alejarse y demostraron que podía discriminar entre un estímulo de monta, uno de intromisión y una eyaculación, ya que las latencias de regreso con el macho son diferentes después de cada tipo de estímulo. Es decir, las hembras tardan menos tiempo en regresar con el macho después de una monta que después de una intromisión y tardan menos tiempo en regresar después de una intromisión que después de una eyaculación (Pierce et al., 1960, Erskine et al., 1985). Gracias a esta posibilidad de regular la cópula, se observaron por primera vez componentes tanto apetitivos como aversivos para la hembra en el contexto de la cópula. Es posible evaluar el estado motivacional asociado a la conducta utilizando diversos métodos de estudio en condiciones de laboratorio, por ejemplo cruzar un piso electrificado, condicionamiento operante para obtener un macho, preferencia de lugar condicionada entre otros.

En nuestro el laboratorio utilizamos cajas de cópula que están divididas por una barrera que tiene una pequeña abertura por donde la hembra por ser más pequeña puede pasar libremente regulando así la estimulación sexual que recibe del macho (Erskine, 1986). En estudios desarrollados en el laboratorio, se ha demostrado que la motivación sexual de las hembras es mayor cuando ellas regulan la cópula (Martínez et al., 2001; Paredes, 1999). También se demostró que el poder regular los contactos copulatorios es fundamental tanto para las hembras como para los machos para desarrollar un estado afectivo positivo, el cual por sus características reforzantes, puede ser evaluado por el condicionamiento de preferencia de lugar (CPL) (Camacho et al., 2004; Paredes, 1999). Finalmente se probó que este estado reforzante es dependiente del sistema opioide, ya que la administración de NX bloquea la preferencia de lugar condicionada inducida por la CR (García-Horsman et al., 2008; Martínez et al., 1999).

La CR además de impactar en estados motivacionales, tiene consecuencias fisiológicas y plásticas importantes para la reproducción. Las consecuencias fisiológicas fueron evaluadas por el grupo de la Dra. Mary Erskine (1985) quienes demostraron que la CR provee una estimulación vaginocervical de cualidad diferente, reportada como un aumento en el intervalo entre intromisiones en comparación con la cópula no regulada,

lo cual maximiza la estimulación necesaria para producir cambios neuroendócrinos que aseguran el éxito reproductivo. Específicamente, se observa una inducción más rápida del estado de preñez o pseudopreñez con menos intromisiones en comparación con la cópula no regulada. Esto se ha asociado con un aumento en los niveles de prolactina, el cual desencadena señales endócrinas para el mantenimiento del embarazo. Además, las hembras que regulan la cópula tienen un mayor número de crías (Oilman et al., 1979 en Erskine, 1985).

Nuestro grupo de trabajo fue el primero en demostrar una de las consecuencias plásticas que tiene la CR especialmente en la NG del BO. El primer trabajo se realizó en hembras que regularon la cópula y utilizando el fármaco 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) como marcador de proliferación celular, se observó que a los 15 días posteriores a la conducta sexual, incrementó la densidad de células inmunorreactivas para BrdU (IR BrdU) en la capa granular del BOA (Corona et al., 2011). La repetición de esta conducta tiene un efecto potenciador, ya que cuando las hembras son expuestas a 4 sesiones de CR, se observa un incremento en la densidad de células IR BrdU en otras áreas como la capa granular del bulbo olfatorio principal (BOP) (Arzate et al., 2013). Esto señala que la CR tiene un impacto en la proliferación celular y número de células que llegan al BO (Corona et al., 2015). Para poder demostrar que dichas células se integran a los circuitos existentes del BO y sobreviven, se determinó si dichas células persisten tras 45 días tanto en la condición de una sesión de CR (Corona et al., 2015), 4 sesiones (Ortiz et al., en preparación) o 10 sesiones (Alvarado-Martínez et al., en preparación). Los resultados indican que el número de células nuevas en el grupo de CR ya no es diferente a los demás grupos. Sin embargo, el grupo de CR presenta un mayor número de células que se diferencian a neuronas y que además, expresan c-Fos tras la exposición a un segundo encuentro sexual justo antes del sacrificio a los 45 días (Corona et al., 2015). Lo anterior sugiere que la cópula regulada favorece la NG en el BO, así como la activación de éstas nuevas células ante la presentación de un estímulo sexual.

1.2. Neurogénesis

La plasticidad cerebral se refiere a la habilidad del cerebro de cambiar su estructura y función durante la maduración, aprendizaje, cambios medioambientales y patologías e involucra diversos niveles de organización desde moleculares hasta sistemas enteros de redes neuronales (Lin et al., 2015). Sin embargo, durante la mayor parte del siglo pasado, una gran parte de los neurocientíficos creían que el cerebro era esencialmente una estructura inerte e incapaz de generar nuevas neuronas. Estas ideas se derivaron del dogma establecido por el neuroanatomista Santiago Ramón y Cajal, basado en sus observaciones en la arquitectura del cerebro después del nacimiento, que establecía que la plasticidad decrecía con la edad (Lin et al., 2015).

Alrededor de los años 50, el término NG se utilizaba exclusivamente para el significado embrionario de génesis del sistema nervioso debido a que no estaba demostrado que las neuronas se generaran después de terminar el desarrollo (Ming et al., 2005). Sin embargo, a principio de la década de los años 60, el grupo de Altman utilizando timidina tritiada, detectó cierta actividad proliferativa en el cerebro, dando la primera evidencia de la generación de nuevas células en el hipocampo de rata adulta (Altman et al., 1965), y en el BO (Altman et al., 1969) rompiendo así un dogma que estaba establecido desde los escritos de Santiago Ramón y Cajal en 1913.

Años más tarde, Paton y Nottenbohm (1989) estudiaron en pájaros cantores una estructura cerebral que aparece al comenzar la época de primavera pero que es estacional y desaparece al final de la etapa reproductiva y la llamaron "del canto" o "X". Es así como se demostró la integración funcional de nuevas células en el sistema nervioso central. Posteriormente, en los años 90, ocurrieron dos descubrimientos; la migración masiva de neuroblastos generados en la zona subventricular (ZSV) hacia el BO (Lois et al., 1994) y el aislamiento de células madre de adulto (Reynolds et al., 1992). Además, gracias a los estudios de Kuhn y colaboradores (1996), se introdujo el uso del fármaco 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU).

El fármaco BrdU es una halopirimidina, análogo de la timidina y es incorporado al ADN durante la fase de síntesis en el ciclo celular y es posible revelarlo posteriormente utilizando protocolos de inmunohistoquímica (IH). Cabe destacar que dicho fármaco es estrictamente un marcador de síntesis de ADN, y puede ser incorporado en procesos de proliferación celular, reparación de ADN, aborto de reentrada al ciclo celular y duplicación génica (Taupin et al., 2007), por lo que inicialmente se usaba como un antiviral y agente neoplásico (Begg et al., 2000), para determinar el índice de proliferación de tumores (Hoshino et al., 1989; Struikmans et al., 1997). Sin embargo, si se utilizan los debidos controles, BrdU se usa actualmente para marcar proliferación celular y fechar nuevas células, con una administración que va desde los 50 mg/kg hasta los 300 mg/kg (Oboti et al., 2011, Ming et al., 2011), siendo actualmente el método más utilizado para estudiar NG adulta *in situ* (Taupin et al., 2007).

Gracias al uso de éste fármaco, se extendió la descripción del proceso de NG en diferentes especies de mamíferos incluyendo al ser humano (Eriksson et al., 1998) y actualmente se reconocen dos nichos neurogénicos; la zona subgranular del giro dentado y la zona subventricular localizada en las paredes de los ventrículos laterales. Las estructuras cerebrales que incorporan nuevas neuronas son el giro dentado del hipocampo y el BO (Alvarez-Buylla et al., 2002 y Lledo, 2008). Sin embargo, cada vez son más los estudios que proponen nuevos nichos neurogénicos y células nuevas fuera de éstas dos estructuras denominados como órganos circunventriculares, localizados a lo largo del tercer y cuarto ventrículo, en los cuales también ha sido posible encontrar precursores neuronales (Lin et al., 2015; Niwa et al., 2016). Para este estudio, es de interés principal la NG en el BO, por lo que a continuación se explicarán los sistemas olfativos y el proceso de NG en él.

1.2.1 Sistemas olfativos

Los animales procesan información proveniente del medio ambiente y discriminan señales que son esenciales para su adaptación y supervivencia, por lo que muchas de estas señales influyen directamente en su comportamiento. Los sistemas sensoriales encargados del procesamiento de señales químicas impactan en la regulación fisiológica, respuestas emocionales (miedo o ansiedad), funciones reproductivas (conducta sexual o maternidad) y comportamiento social (reconocimiento de conespecíficos o intrusos) (Lledo et al., 2005). Especialmente en las funciones reproductivas, hembras y machos emiten diversos tipos de estímulos que afectan diferentes modalidades sensoriales (visuales, auditivas, olfativas) para atraer individuos del sexo opuesto. Diversos estudios han demostrado que las claves olfativas están involucradas en la selección apropiada de parejas sexuales en mamíferos como en hurones, hámster, ratones y ratas (Kelliher et al., 2002). El sistema olfatorio de los mamíferos es un órgano capaz de detectar y procesar estímulos odorantes. En el primer proceso de detección, está involucrada la transducción de señales se lleva a cabo en el neuroepitelio (Figura 1) y el procesamiento de la información sensorial se lleva a cabo en el BO y centros corticales superiores (Figura 2 y 3) (Reed et al., 1990).

En primer lugar la detección del odorante toma lugar en el neuroepitelio olfatorio, un componente pseudoestratificado que subyace en una estructura cartilaginosa de turbinas dentro de las regiones posteriores de la cavidad nasal. La diversidad química de los odorantes percibidos sugieren la presencia de proteínas específicas de detección, expresados en los cilios de las células sensoriales, los cuales se encuentran expuestos al ambiente externo y son el sitio de inicio de señalización transmembranal (Reed et al., 1990). En la Figura 1, se describe el proceso desde la cadena de eventos de transducción de señales químicas hasta la generación de potenciales de receptor (Lledo et al., 2005; Zou et al., 2009).

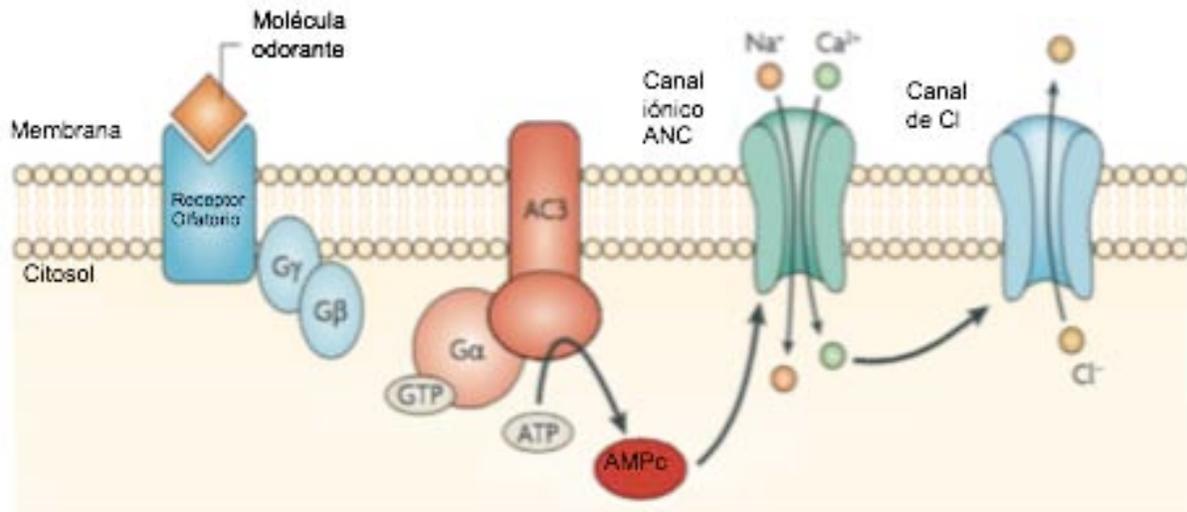


Figura 1. Cadena de eventos desde la activación del receptor a un odorante hasta la apertura de canales iónicos. Tras la unión de la molécula odorante con su receptor en la membrana plasmática de los cilios de la neurona sensorial olfatoria, inicia una cascada de transducción dependiente de proteínas G (disociación de la subunidad α) y GTP (guanosín trifosfato) que activa la enzima adenilato ciclasa (AC), quien produce el segundo mensajero AMPc (adenosín monofosfato cíclico). Posteriormente, AMPc se une a canales iónicos asociados a nucleótidos cíclicos (ANC), los cuales tras su apertura incrementan el flujo de cationes a la célula (Na^+ y Ca^{2+}) y también se favorecen la salida de aniones por canales iónicos de cloro (Cl^-) despolarizando así la membrana de la neurona sensorial olfativa. (Figura modificada de Zou et al., 2009).

Los cuerpos celulares de las neuronas sensoriales olfativas, se encuentran en la parte media del neuroepitelio olfatorio y extienden sus procesos hacia la superficie epitelial a través de un axón no ramificado que atraviesa la placa cribiforme hacia el BO.

En el BO, los axones de las células sensoriales convergen en glomérulos específicos en donde hace sinapsis con las dendritas de interneuronas locales (células periglomerulares) y neuronas de segundo orden que son consideradas como la célula principal de este sistema llamadas mitrales. Las dendritas laterales de las células mitrales contactan las dendritas apicales de células granulares o de axón corto. Dicha disposición da como resultado la citoarquitectura del BO (Figura 2).

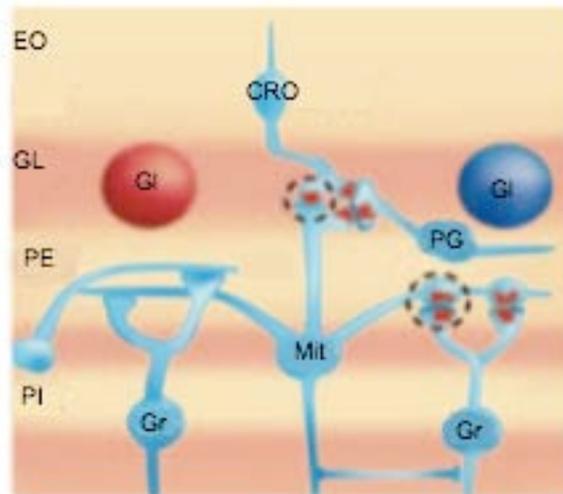


Figura 2. Esquema de las distintas capas del bulbo olfatorio. En primer lugar se encuentra el epitelio olfatorio (EO) en donde se encuentran los somas de las células receptoras olfativas (CRO). Después en la capa glomerular (GL), se localizan interneuronas locales (PG) y glómerulos (Gl) formados por sinapsis dendrodendríticas de las células sensoriales con las dendritas de las células mitrales (Mit), cuyos somas se encuentran entre la capa plexiforme externa (PE) y la capa plexiforme interna (PI), en donde se localizan los somas de las células granulares (Gr), que contactan dendritas laterales de las células mitrales (Modificado de Lledo et al., 2005).

Finalmente, los axones de las células mitrales forman el tracto lateral olfatorio, éste abandona el BO y proyecta a estructuras corticales diversas de acuerdo a la división anatómica que pertenezcan, en este sentido, existen dos divisiones macroscópicas en el roedor; el principal y el accesorio. Los axones de las células mitrales del BOP proyectan a la corteza primaria olfatoria, que comprende la corteza piriforme, el núcleo olfatorio anterior, la amígdala lateral y la corteza entorrinal. Por otro lado, los axones de las células mitrales del BOA son enviadas a la amígdala vomeronasal y a núcleos hipotalámicos (Figura 3).

El sistema olfatorio principal (SOP) que procesa miles de moléculas volátiles llamadas odorantes está compuesto por la cavidad nasal, el BOP y el epitelio olfatorio. Mientras que el sistema olfatorio accesorio (SOA) incluye al órgano vomeronasal, los nervios vomeronasales y el BOA. El órgano vomeronasal está especializado en la detección de compuestos químicos como feromonas que proveen información sobre el estado social o sexual de otros individuos dentro la misma especie (Lledo et al., 2005).

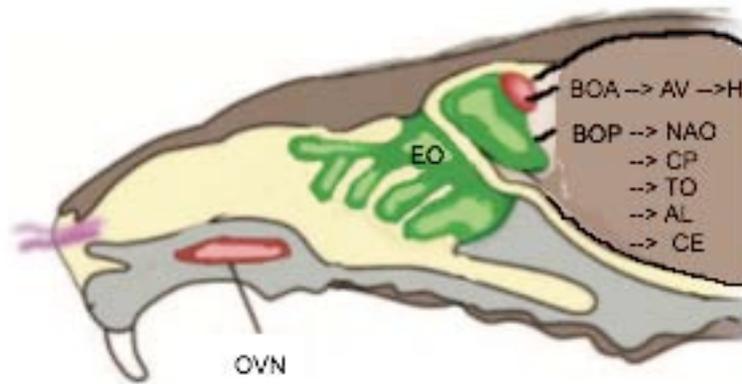


Figura 3. Sistema olfatorio de un roedor. Vista sagital simplificada del cráneo de la ratona, el sistema olfatorio principal está representado en verde y comprende el epitelio olfatorio principal (EO) y bulbo olfatorio principal (BOP) con sus principales proyecciones nervio olfatorio accesorio (NOA), corteza peririnal (CP), tubérculo olfatorio (TO), amígdala lateral (AL) y corteza entorrinal (CE). El sistema olfatorio accesorio se muestra en rojo integrado por el órgano vomeronasal (VNO) y bulbo olfatorio accesorio (BOA), con sus principales proyecciones amígdala ventral (AV) e hipotálamo (H) (Modificada de Lledo et al., 2005).

Originalmente se había propuesto que el SOP detectaba olores volátiles asociados a presas o comida y que el SOA detectaba sustancias de alto peso molecular no volátiles que influenciaban comportamientos reproductivos y funciones neuroendócrinas. Sin embargo, diferentes autores sugieren que esta división no es estricta, ya que aparentemente los dos sistemas interactúan para mediar respuestas sociales a señales químicas de conoespecíficos en una variedad de especies (Bakker, 2003), y recientemente en estudios realizados por el grupo del Dr. Larriva, se obtuvo una demostración anatómica y funcional (eletrofisiología) de la existencia de proyecciones de células del BOA con el BOP, así como una relación funcional entre ellos (Vargas-Barroso et al., 2016).

Se han descrito cambios plásticos a lo largo de la vida en el sistema olfatorio. Por un lado, las neuronas sensoriales se renuevan periódicamente a partir de células precursoras que residen en la lámina basal del epitelio olfatorio. Una vez maduras, dichas células mandan axones que son recubiertos por células gliales y esto les permite ingresar al sistema nervioso central, en correspondencia con los glomérulos del BOP, lo cual implica un continuo remodelamiento de conexiones neuronales entre los

glomérulos. Estas neuronas son reemplazadas en condiciones fisiológicas tanto en la mucosa olfatoria como en el órgano vomeronasal y su promedio de vida es de 30 a 120 días. Por otro lado, el BO incorpora nuevas células, que provienen de precursores originados en la zona subventricular (ZSV) y siguen una ruta migratoria al principio tangencial a la vía migratoria rostral y posteriormente radial para incorporarse a las capas granulares o glomerulares, definiéndose principalmente como interneuronas inhibitorias, ya sean granulares o periglomerulares. La migración desde la ZSV hasta el BO toma un periodo aproximado de 15 días (Oboti et al., 2011).

1.2.2 Neurogénesis en el BO

Se ha propuesto que la adición de nuevas neuronas en el BO consta de 3 etapas; proliferación, migración e incorporación (Figura 4), las cuales son susceptibles a factores tanto intrínsecos como extrínsecos de modulación. En la primera etapa la proliferación inicia en la zona subventricular (ZSV) en las paredes mediales de los ventrículos laterales, en donde las células precursoras se dividen para dar lugar a células precursoras neuronales (neuroblastos). En la segunda etapa, los neuroblastos migran a través de la vía migratoria rostral hacia el BO y en la tercera etapa hay incorporación celular a las diversas capas del mismo BO (glomerular y granular) (Lledo et al., 2006).

Existen diversos factores (Figura 4) intrínsecos expresados tanto en células precursoras como en progenitoras que controlan la tasa de proliferación y el compromiso a cierto linaje de las nuevas células. Además, factores externos como neurotransmisores, hormonas y factores de crecimiento (FC) también modulan estos programas intrínsecos. También se ha demostrado que ciertas manipulaciones experimentales tienen impacto en diferentes etapas de la NG, por ejemplo, la exposición a olores que favorece la supervivencia de las nuevas células (Lledo et al., 2006).

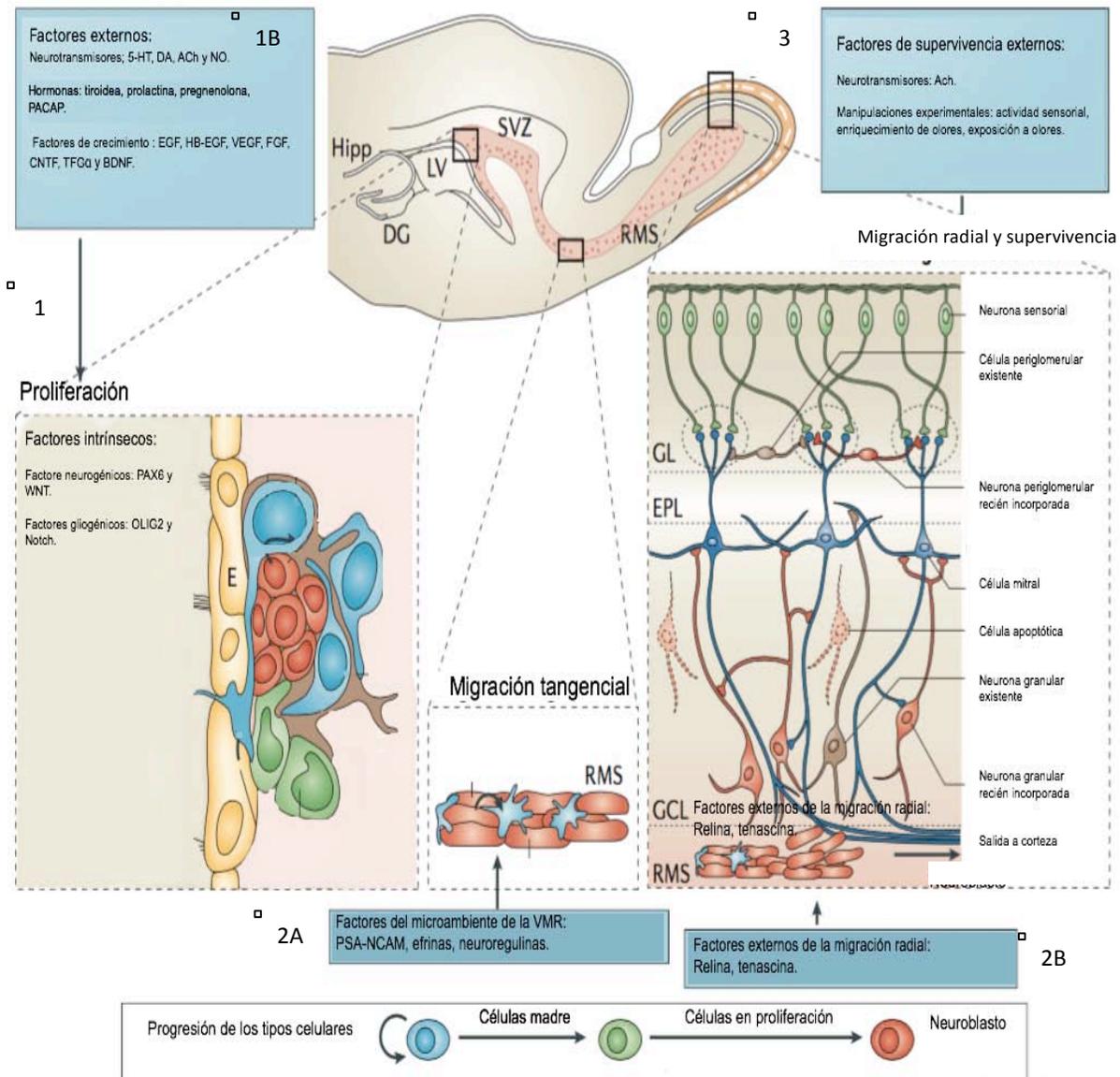


Figura 4. Etapas de la NG en el BO y su modulación: 1) Proliferación en la ZSV, expresión de factores intrínsecos (1A) como programas neurogénicos (PAX6/WNT) o gliogénicos (OLIG2/Notch), así como factores externos que la modulan (1B) como neurotransmisores; serotonina (5-HT), dopamina (DA), acetilcolina (ACh) y óxido nítrico (NO), hormonas (tiroidea, prolactina, pregnenolona, y factores de crecimiento (FC) como EGF (FC epidérmico), HB-EGF (FC epidérmico de unión a heparina), VEGF (FC endotelial vascular), FGF (FC de fibroblastos), CNTF (FC ciliar), TFG α (FC transformante alfa) y BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro). 2A) Migración tangencial y factores externos del microambiente de la vía migratoria rostral (RMS) así como migración radial y factores externos de atracción o repulsión de los neuroblastos (2B). C) Incorporación a las diversas capas y diferenciación a dos subtipos de interneuronas; granulares y periglomerulares y finalmente factores externos que modulan la supervivencia como neurotransmisores ACh (acetilcolina) y manipulaciones experimentales (actividad sensorial, enriquecimiento de olores, exposición a olores). Finalmente en la parte inferior se muestra la progresión de los tipos celulares a lo largo de la NG desde las células madre hasta neuroblastos (Modificado de Lledo et al., 2006).

El BO necesita de manera continua el recambio celular como un mecanismo adaptativo que permite a los animales discriminar entre diferentes tipos de olores en un ambiente constantemente en cambio (Moreno et al., 2009), por lo que en ese sentido, el estudio de la NG en la fisiología del sistema olfativo es muy relevante. En lo referente al impacto en la conducta sexual, se sabe que el BO intacto es necesario para el despliegue de la conducta sexual, así como de conductas sociales como lo demostró Feresteyn y colaboradores (2010). En este estudio, la inhibición de la NG deterioró la ejecución de la conducta por parte de las hembras lesionadas, quienes mostraron un pobre desempeño en conductas maternas estereotipadas (Feresteyn et al., 2010).

Por otro lado, como se describió en el inciso anterior, estudios previos en el laboratorio han demostrado que la CR induce la incorporación de nuevas neuronas en la vía migratoria rostral y en la capa granular del BOA a los 15 días después de desplegar la conducta (Corona et al., 2011). El efecto de la repetición de la CR induce un incremento de NG en la capa granular del BOA y en el BOP (en las capas granular y mitral también analizado a los 15 días posteriores a la conducta (Arzate et al., 2013). Además, la proporción de células que se diferencian a fenotipo neuronal es mayor en la condición de CR y la participación que presentan en el sistema olfativo de la hembra, es su activación tras la presentación de estimulación sexual previo al sacrificio (Corona et al., 2015).

Este efecto no se observa en las hembras que no regulan la cópula, y como ya se mencionó, una característica importante de la CR a diferencia de la cópula no regulada es el establecimiento de estados afectivos positivos mediado por opioides (Martínez et al., 2001). También existe evidencia que sugiere que los opioides podrían estar modulando el proceso de NG mediante la estimulación de sus receptores localizados en los nichos neurogénicos y expresados en las células precursoras (Narita et al., 2006).

1.3 Opioides

El uso del opio con fines medicinales y recreativos ha sido descrito desde la época de los griegos hasta la actualidad. Los derivados del opio como la morfina (principal agonista sintético de receptores opioides) y su forma deacetilada, la heroína, representan una de las mayores drogas de abuso en el mundo (Van Ree and De Wied, 1988 en Van Ree et al., 2000) ya que son potentes analgésicos y tienen fuertes propiedades adictivas. Sus consecuencias en la percepción y modulación del dolor, reforzamiento, excitación sexual, estrés, adicciones y emociones, sentaron las bases para el posterior descubrimiento de neuropéptidos y sus receptores, describiendo así el sistema opioide (Lutz et al., 2013, Fichna et al., 2007, Van Ree et al., 2000).

1.3.1. Péptidos opioides

Los primeros opioides endógenos aislados y caracterizados fueron las encefalinas (del Griego “en la cabeza”) (Huges et al., 1980) y posteriormente se describieron las dinorfinas (del griego “poder”). Otras moléculas que han sido identificadas son las endorfinas, dermorfinas, hemorfinas, casomorfinas, deltorfinas, nociceptinas entre otras (Fichna et al., 2007).

Los péptidos opioides endógenos son pequeñas moléculas que se producen naturalmente en el sistema nervioso central, así como en glándulas como la hipófisis y las suprarrenales. Se han identificado tres familias de péptidos opioides clásicos: encefalinas, dinorfinas y endorfinas; cada una se deriva de un polipéptido precursor distinto y tienen una distribución anatómica particular en la rata. El procesamiento enzimático de dichos precursores da lugar a diversos productos; pro-opiomelanocortina (POMC) que da lugar a β -endorfina, pro-encefalina que da lugar a met-encefalina y leu-encefalina, pro-dinorfina que da lugar α , β y α -neo-endorfina y pronociceptina, que da lugar a nociceptina, también conocida como orfanina (Huges et al., 1980; Eguchi, 2004). Una vez terminada su interacción con el receptor, son degradadas rápidamente por

endopeptidasas o enzimas degradadoras de péptidos (Fichna et., al 2007).

Las similitudes estructurales entre las sustancias exógenas con una acción parecida a los opioides y el descubrimiento de agonistas y antagonistas a estas sustancias permitieron identificar diferentes receptores opioides (Van Ree et al., 2000). En 1976, Martin y colaboradores, postularon por primera vez la existencia de diversos tipos de receptores basándose en estudios neurofisiológicos en la médula espinal del perro y los clasificaron como μ , κ δ . Otra terminología propuesta es OP1, OP2 y OP3 para el μ , κ δ respectivamente. Años después se clasificó el cuarto receptor y se le denominó ORL1 por sus siglas en inglés opioid receptor like-1 o también se le conoce como receptor para nociceptina (Dhawan et al., 1996). Además, se ha propuesto una subdivisión del receptor tipo μ (μ_1 y μ_2), basado en su afinidad al fármaco [3 H]-dihidromorfina (Whistler et al., 1999).

1.3.2 Receptores para opioides

Los receptores para péptidos opioides pertenecen a la familia de receptores con 7 pasos transmembranales acoplados a proteína G. Dichos receptores son activados fisiológicamente por los productos de genes de péptidos opioides con diferentes afinidades (Eguchi, 2004). De manera general, la activación de los receptores por su ligando o agonista resulta en la disociación de la proteína G, provocando una serie de efectos cascada abajo, incluyendo la activación del canal iónico de potasio por la subunidad $G\beta\gamma$ y la modulación de la producción de AMPc por la subunidad $G\alpha$. Esto a su vez tiene consecuencias en la actividad de la adenilato ciclasa (AC) que sintetiza AMPc a partir del ATP. Al activarse el receptor e incrementarse los niveles de AC, también se regulan cascadas de señalización como la vía de las cinasas que tienen la capacidad de responder a una variedad de estímulos y transmiten señales tanto intra como inter celulares que tienen implicaciones en respuestas celulares tales como proliferación, diferenciación, apoptosis, factores de regulación de la transcripción, fosforilación de canales y plegamiento de proteínas (Persson et al., 2003; Al-Hasani et

al., 2011). Los receptores a opioides se distribuyen ampliamente en el cerebro de la rata como se observa en la Figura 5.

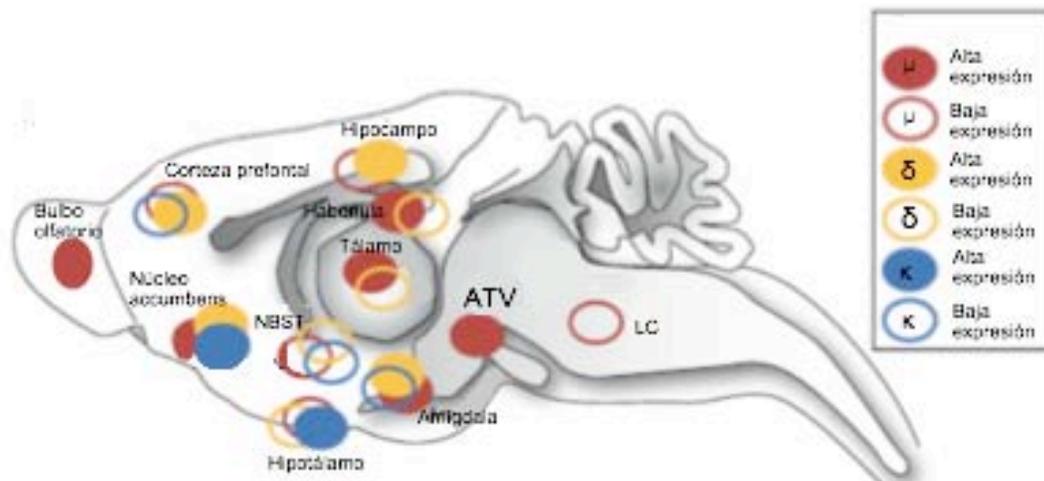


Figura 5. Distribución anatómica de los receptores a opioides según su densidad de expresión; alta o baja para receptores μ (color rojo), receptores δ (color amarillo) y receptores κ (color azul) expresados en diversos circuitos del cerebro de un roedor; bulbo olfatorio, corteza prefrontal, núcleo accumbens, hipocampo, habénula, tálamo, núcleo basal de la estría terminal (nbst), hipotálamo, amígdala, área tegmental ventral (ATV), locus coeruleus (LC) (Modificado de Lutz et al., 2013).

1.3.3 Fármacos agonistas y antagonistas de receptores para opioides

La mayoría de los opioides alcaloides y sus derivados, muestran una alta afinidad por el receptor tipo μ (Greengard et al., 1993) y el ligando endógeno con una de las más altas selectividades para la activación de éste receptor es la endorfina (tipo 1 y 2), así como las encefalinas (Eguchi, 2004). Como fármaco antagonista, es muy común el uso de NX (figura 6) y por su importancia en el presente trabajo, se discutirá en la siguiente sección.

1.3.4 Naloxona

La NX; (5^a)-4,5-Epoxi-3,14-dihidroxi-17-(2-propenil) morfina-6-ona), fue el primer antagonista descrito que bloqueó la actividad del sistema opioide debido al parecido de su estructura química, con la modificación de algunos grupos funcionales (Carroll et al.,

2012). Se caracterizó como un antagonista competitivo, y presenta una mayor afinidad por el receptor μ , sin embargo, también interactúa con κ y δ (Martin et al., 1976).

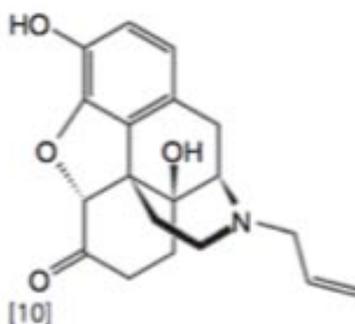


Fig. 6 Estructura molecular de la (5^a)-4,5-Epoxi-3,14-dihidroxi-17-(2-propenil) morfina-6-ona; NX (modificado de Kim et al., 2015)

Dicho fármaco es administrado por vías parenterales como intravenosa, intramuscular, subcutánea e intranasal (Dowling et al. 2008). Una vez absorbido, cruza la barrera hematoencefálica y dependiendo la dosis de administración; 2 mg, 13 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, alcanza porcentajes de saturación de 80.6%, 50.0% y 42.6% de receptores tipo μ respectivamente. El inicio de la acción farmacológica depende de la vía de administración y puede variar en un rango de 30 segundos a 6 minutos y la duración abarca desde 20 a 90 minutos (Yasen et al., 2007). La corta duración del efecto se atribuye a que este fármaco es altamente lipofílico y es distribuido rápidamente a otros tejidos y plasma en comparación con la morfina (Ngai et al., 1976). Finalmente, la NX es metabolizada en hígado y forma el metabolito primario naloxona-3-glucuronida. El tiempo de eliminación es de 33 a 90 minutos (Kim et al., 1997).

El receptor tipo μ tiene una naturaleza bifásica, ya que dependiendo la dosis y tratamiento agudo o crónico, la exposición a la NX tiene efectos antagónicos, por ejemplo tiene efectos analgésicos a dosis bajas e hiperalgésicos a dosis altas (Lasagna et al., 1965).

1.3.5 Blancos moleculares de la naloxona

Clínicamente, el uso más común de la NX es el tratamiento de sobredosis por opiodes, como un complemento en el tratamiento de adicciones (alcohol, opiodes y otros narcóticos) y para evitar tolerancia en analgesia en tratamientos con opiáceos (Morris et al., 2001; Watkins et al., 2009). Sin embargo, diversos estudios han demostrado que la administración de NX tiene un efecto benéfico en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas o eventos dañinos cerebrales como infarto, trauma, lesiones de médula espinal y choques sépticos (Faden et al., 1992; Fadis et al., 1984; Kan et al., 1992). Actualmente existe una amplia literatura que asocia la NX con propiedades farmacológicas neuroprotectoras ante daño cerebral (Tabla 1). La mayoría, presupone una modulación de la activación de microglía (Liu et al., 2000a; Liu et al., 2002), así como inducción de apoptosis neuronal en condiciones de estrés para el mantenimiento de la eficiencia de la fisiología celular normal (Cheng et al., 2014). Estas observaciones sugieren un amplio espectro de funciones para este fármaco dependiendo la dosis, órganos o tipo de células involucradas. Por ejemplo, en sistema nervioso central, además de interactuar con los receptores clásicos neuronales (μ , κ y δ), se ha demostrado que la NX interactúa con otras células gliales, con células precursoras que expresan receptores opioidérgicos (Sargeant et al., 2008), microglía (Hong et al., 2009), astrogliá (Hauser et al., 1998) y oligodendroglía (Knapp et al., 1998). Sin embargo, además de sus efectos sobre el sistema nervioso y receptores opiodes clásicos, la NX evoca una serie de eventos bioquímicos en otros tipos celulares (Jin et al., 1994) a través de receptores opiodes interactuando en diversos sitios de reconocimiento (Wang et al., 2009) o con mecanismos independientes de receptores opiodes (Wang et al., 2012).

Las propiedades de la NX se han estudiado en varios niveles como el celular (plaquetas, macrófagos, microglía), organelos (retículo endoplásmico o mitocondrias), proteínas de membrana, canales iónicos (K^+), segundos mensajeros o interactuando directamente con vías de señalización, por ejemplo el grupo de Saklardis (1983), demostró una interacción directa de la NX con la enzima AC que no está

necesariamente relacionada con la modulación clásica por los receptores opioides.

Además, en diversos laboratorios se han demostrado acciones de NX en receptores no opioides y la activación de microglía (Wang et al., 2012) a través de los receptores tipo Toll, que constituyen una familia de proteínas asociadas al sistema inmune que reconocen patrones moleculares y estimulan una gran variedad de respuestas inflamatorias (Hutchinson et al., 2010). En el caso de Watkins y su grupo, han reportado que NX tiene un efecto antagonista en el receptor tipo Toll 4 (TLR4) en células microgliales), teniendo como resultado neuroprotección (Watkins et al., 2009). También el grupo de Wang (2012), reportó una interacción de la NX con la subunidad catalítica de este tipo celular, teniendo como consecuencia una inhibición de NOX2 (NADPH oxidase) y producción de súperoxidos, teniendo la NX un efecto antioxidante.

A continuación, se presenta una tabla (Tabla 1), que resume algunos ejemplos de diversos blancos moleculares con los que interactúa la NX, así como el mecanismo de acción propuesto y su efecto en la fisiología celular.

Blancos	Mecanismo de interacción	Efectos
Plaquetas.	Reducción del incremento en la agregación plaquetaria.	Mejora circulación cerebral en isquemia lateral y contralateral (Sheu et al., 1998).
Células PC12 (obtenidas de tumor de médula adrenal).	Incrementa la expresión génica de sensores de estrés del retículo endoplásmico.	Mantenimiento de la eficiencia de la fisiología celular normal a través de la inducción de apoptosis en condiciones de estrés (Seo et al., 2014).
Proteína de andamiaje de filamentos de actina (FNLA) en el receptor μ .	Interactúa con las proteínas FNLA del receptor μ y evita el acoplamiento con el receptor, previene la activación de la proteína Gs asociado a la exposición aguda de alta dosis o crónica.	Previene el acoplamiento alterado, (activación de la proteína Gs en lugar de Gi/o) atenuando tolerancia y dependencia asociados a drogas opioides (Wang et al., 2009).
Enzima NADPH (coenzima anabólica).	Interactúa con la subunidad catalítica de la enzima NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato).	Antioxidante, modula la producción de especies reactivas de oxígeno (Chang et al., 2000).
Canales de K ⁺ en linfocitos humanos (Jurkat cells).	Acciones en canales de potasio, sensibles a NX y a β -endorfina, los cuales en presencia de mitógenos, pueden cambiar su conformación.	NX interactúa con un sitio de un inhibidor del canal de potasio y ejerce influencia sobre las propiedades electrofisiológicas en presencia de mitógenos (Millar et al., 1997).
Microglía.	Inhibición de factores pro-inflamatorios TNF- α (factor de necrosis tumoral), IL-6 (interleucina tipo 6), proteína atrayente de monocitos y súper-óxidos tras su estimulación.	Antioxidante y antiinflamatorio que previene la formación de placas arterioescleróticas (Liu et al., 2006).
Proteínas de choque térmico (Bv2 microglial cell culture).	Presentes en mitocondria y actúan en respuesta a estrés factores (oxidativo, temperatura, radiación ultravioleta), activando elementos de respuesta y éstos a su vez factores transcripcionales.	Efectos neuroprotectivos que inducen apoptosis a través de su ligando, TLR-4 (toll-receptor like 4) y vía NF- κ B (factor nuclear κ B)(Cheng et al., 2014).
Neuronas dopaminérgicas.	Atenúa degeneración asociada con péptido β -amloide por la inhibición de microglía.	Posible papel neuroprotector en enfermedad de Alzheimer (Liu et al., 2000a, Liu et al., 2002).
Macrófagos activados por endotoxinas.	Favorece la vía de señalización PI3K (inositol trifosfato) (γ y δ) y su blanco Akt. Decrementan las moléculas pro-inflamatorias y se incrementa el factor nuclear NF-KB.	Al activar la vía PI3K se incrementa la capacidad anti-inflamatoria endógena y mantiene homeostasis fisiológica preservando la integridad del sistema inmune (Wang et al., 2014).

Tabla 1. Ejemplo de blancos moleculares del fármaco NX, mecanismos de acción y efectos.

1.3.6 Opioides y neurogénesis

Gracias a manipulaciones farmacológicas en cultivos celulares (Persson, 2003) en las diferentes etapas del proceso de NG como son la proliferación, la apoptosis y la diferenciación neuronal (Tegeder y Geisslinger, 2004), se ha demostrado la expresión de opioides endógenos y sus receptores en células progenitoras, así como en regiones neurogénicas especialmente en la SVZ (Tripathi et al, 2008) lo cual sugiere que éstos tienen un papel importante en la regulación de la NG del BO.

De manera clásica se ha caracterizado que los opioides endógenos (por ejemplo β -endorfina) sirven como inhibidores tróficos naturales afectando tanto la fase de mitosis como la fase de síntesis de ADN en el cerebro en desarrollo (Barg et al., 1993; Zagon et al., 1991). Además, se ha demostrado que la activación del receptor μ inhibe la proliferación y el receptor δ inhibe la diferenciación neuronal (Eisch et al., 2000, Hauser et al., 2000, Reznikov et al., 1999).

Sin embargo, en un estudio realizado con cultivos celulares de células progenitoras hipocampales aisladas de tejido de rata adulta, se observaron efectos antiproliferativos cuando se reducía la señalización opioidérgica bloqueando sus receptores con antagonistas como NX o naltrindol. También se observó que la NX favorece la diferenciación a neuronas y al mismo tiempo reduce la diferenciación en oligodendrocitos y astrocitos (Persson et al., 2003).

Por otro lado, en estudios de tejido de cerebro adulto, los agonistas de péptidos opioides disminuyen la muerte celular programada de las células progenitoras del hipocampo e incrementan la supervivencia de las neuronas nuevas con un papel neuroprotector y facilitador de diferenciación a linaje neuronal (Narita et al., 2006, Pettit et al., 2012). En conjunto, estas evidencias demuestran claramente que los opioides endógenos están involucrados en diferentes aspectos de la NG.

Una de las manipulaciones experimentales que ha permitido estudiar el papel de

los opiodes endógenos es el ejercicio voluntario. Dicha condición además de inducir un estado afectivo positivo evaluado con el CPL, incrementa los niveles de β -endorfina en el fluido cerebroespinal hasta 48 hrs después de haber realizado la conducta y como consecuencia en la NG se observó que esta condición incrementa tanto la proliferación celular como de la supervivencia de neuronas nuevas en el hipocampo del ratón (van Praag et al., 1999). Sin embargo, se ha documentado que esta condición (ejercicio voluntario) no incrementa la proporción de células nuevas en el BO (Brown et al., 2003) contrario a lo que se ha demostrado con la CR y la NG en el BO (Arzate et al., 2013; Corona et al., 2001).

1.3.7 Opioides y conducta sexual

En lo relacionado con la conducta sexual, se ha propuesto que los péptidos opioides actúan como neurotransmisores moduladores en el cerebro y forman parte del sistema neurohumoral al influir sobre diversas funciones centrales (Lutz et al., 2013).

Derivado de observaciones en estudios clínicos de analgesia en donde se utilizaron fármacos agonistas de receptores para opioides, se ha demostrado que existe dimorfismo sexual entre los sujetos, lo cual daría cuenta de particularidades en la respuesta al estrés, emociones y reforzamiento (Loyd et al., 2014). Además, como se mencionó con anterioridad, la modulación hormonal impacta en la fisiología del sistema tanto en la producción diferencial de péptidos como en la expresión de diferentes receptores tanto en hembras como en machos (Loyd et al., 2014).

En el caso de la rata macho, la administración de morfina, heroína y metadona tienen un efecto inhibitor en la conducta sexual, mientras que la NX tiene un efecto facilitador en machos inexpertos, e induce erección del pene (Argiolas et al., 1999). En la rata hembra, la participación del sistema opioide endógeno se ha documentado en la ejecución de la conducta sexual presentando efectos tanto inhibitorios como excitatorios dependiendo de factores como la dosis o las áreas del cerebro en donde se administran los opioides.

Otra diferencia importante es el estado endócrino de la hembra, ya que se sabe que los esteroides sexuales tienen efectos tanto en poblaciones neuronales de opioides como en sus receptores (Argiolas et al., 1999). Por ejemplo, el estradiol juega un papel importante al incrementar los niveles de la hormona estimulante de melanocitos, así como el número de receptores para ella, que podría ser la base del efecto de los estrógenos sobre el deseo sexual (Scepkowski et al., 2006). Por otro lado, el estrógeno atenúa rápidamente el efecto hiperpolarizante de los opioides en las neuronas del núcleo arqueado (Lagrange et al., 1997) o la internalización del receptor μ en estructuras relacionadas con la ejecución de la conducta sexual como el área preóptica medial y amígdala (Eckersell et al., 1998), esto tiene como consecuencia una reducción en el despliegue de la conducta sexual de la hembra (McCarthy et al., 1996).

También se ha propuesto que la liberación de opioides endógenos durante la cópula contribuye a las consecuencias reforzantes (Agmo, 1999) y a la eliminación de las consecuencias aversivas de la cópula posiblemente como resultado de los efectos analgésicos de los opioides (Paredes et al., 2001).

Dichos efectos positivos asociados a la cópula han sido estudiados en el laboratorio, por medio del paradigma de CPL. Dicho protocolo permite establecer comparaciones entre estímulos para determinar si tienen capacidad reforzante y se infiere al cuantificar el tiempo que pasa un animal en un compartimiento que asocia con un estado fisiológico. En el trabajo de Martínez y colaboradores (1999) se determinó que la CR por la hembra induce cambios en la preferencia de lugar y se evaluó la participación del sistema opioide, al administrar NX IP en una dosis de 4mg/kg (Martínez, et al., 2001), lo cual tuvo como resultado un bloqueo del CPL al lugar inducido por la CR. Esto sugiere que el estado afectivo positivo inducido por opioides juega un papel crucial en los mecanismos de reforzamiento, así como en la modulación de la NG (Persson et al., 2004). Sin embargo, no se sabe si los péptidos opioides liberados durante diversas condiciones de estimulación sexual podrían modular la NG en el BO, por lo que el presente proyecto evalúa esta posibilidad.

2. Trabajo de investigación

2.1 Planteamiento del problema

La NG es un fenómeno plástico que puede ser modulado a lo largo del proceso de proliferación, migración, incorporación y supervivencia tanto por factores endógenos como exógenos tales como hormonas o neurotransmisores (Lledo et al., 2006). En el laboratorio se demostró que la CR estimula la NG en el BOA (Corona et al, 2011). Una de las diferencias entre la CR y la cópula no regulada, es el establecimiento de un estado afectivo positivo, dependiente de opioides, ya que la administración de NX antes de la CR, bloquea el CPL (Martínez et al., 2001). Además, los opioides endógenos, así como sus receptores, se expresan en células progenitoras, en donde regulan vías de señalización que activan factores de transcripción asociados a proliferación celular y diferenciación neuronal (Persson et al., 2003, Al-Hasani et al., 2001). Existen ciertas manipulaciones experimentales que han demostrado la relación entre los opiodes endógenos y un incremento en la NG como es el caso del ejercicio voluntario (van Praag et al., 1999). Sin embargo, no se conoce el papel que juegan los péptidos opioides sobre el incremento en la NG inducida por la CR en la rata hembra.

2.2 Justificación

Los factores involucrados en el incremento en la NG en el BO inducida por la CR se desconocen. Sin embargo, se ha demostrado que un factor involucrado en la CR es el establecimiento de estados afectivos positivos mediados por opioides. Por lo tanto, se estudiará la relación del sistema opioide endógeno sobre la NG inducida por la estimulación sexual regulada en ratas hembra por medio del bloqueo farmacológico de los receptores del sistema opioide endógeno.

2.3 Pregunta de investigación

¿Cuál es el efecto de la administración de naloxona sobre la NG en el BO inducida por la cópula regulada en la rata hembra?

2.4 Hipótesis

1. La NX disminuirá el número de células nuevas que se incorporen al BO después de la CR.
2. La NX disminuirá el número de células nuevas que se diferencien a neuronas en el BO.

2.5 Objetivo general

Administrar NX para observar el efecto sobre la NG en el BO tras la CR.

2.6 Objetivos específicos

1. Administrar NX y cuantificar el número de células IR BrdU que se encuentran en el BO después de la CR.
2. Administrar NX y cuantificar el número de células IR BrdU que expresan marcadores de linaje neuronal (NeuN) o glial (GFAP).

2.7 Sujetos, materiales y métodos

2.7.1 Animales

Se emplearon 50 ratas hembras de la cepa *Wistar* sexualmente inexpertas con un peso aproximado de 200 g. Se colocaron 4 hembras por caja y fueron mantenidas en un cuarto exclusivo para hembras con ciclo invertido de 12 h de luz y 12 h de oscuridad con comida y agua *ad libitum*. Las hembras fueron ovariectomizadas empleando anestesia de una mezcla de ketamina 70% y xilazina 30% (1 ml/kg por rata). Después de una semana de recuperación inició el experimento. Además de utilizaron 2 hembras en gestación para obtener el cerebro de sus crías (4-5 crías) como control de la IH.

Como animales estímulo, se entrenaron 16 machos de la cepa *Wistar* de 300 g en pruebas de conducta sexual con hembra receptoras. Se seleccionaron los machos

que eyacularan en 3 pruebas de treinta minutos y de esta manera fueron considerados machos sexualmente expertos. Se mantuvieron con ciclo invertido de 12 h de luz y 12 h de oscuridad con comida y agua *ad libitum*. Los protocolos experimentales fueron aprobados por el comité de bioética del Instituto de Neurobiología que se apega a lineamientos nacionales (NOM-062-ZOO-1999) e internacionales (se apega a la norma de Institutos de Salud en EUA) para el uso de animales en experimentación.

2.7.2 Materiales, fármacos y hormonas

Para inducir receptividad sexual en las hembras se les administró de manera subcutánea 17- β estradiol (25 μ g/rata) disuelto en aceite de maíz en un volumen de 2 μ l 48 h antes de la conducta sexual y progesterona (1 mg/rata) 4 h antes de la prueba. Al grupo experimental de CR con bloqueo de receptores a opioides, se le administró intraperitonealmente 1 minuto antes de la interacción sexual una dosis de hidrocloreuro de NX (4 mg/kg) disuelta en un volumen de 1 ml/kg de solución salina. Mientras que a los demás grupos se les administró 1 ml/kg de solución salina. Las hembras fueron inyectadas intraperitonealmente con tres dosis (100 mg/kg) de BRdU, la primera se administró 60 minutos antes de la prueba de conducta sexual, la segunda al término de la prueba y la tercera dosis se inyectó 60 minutos después de la prueba (ver Figura 7).

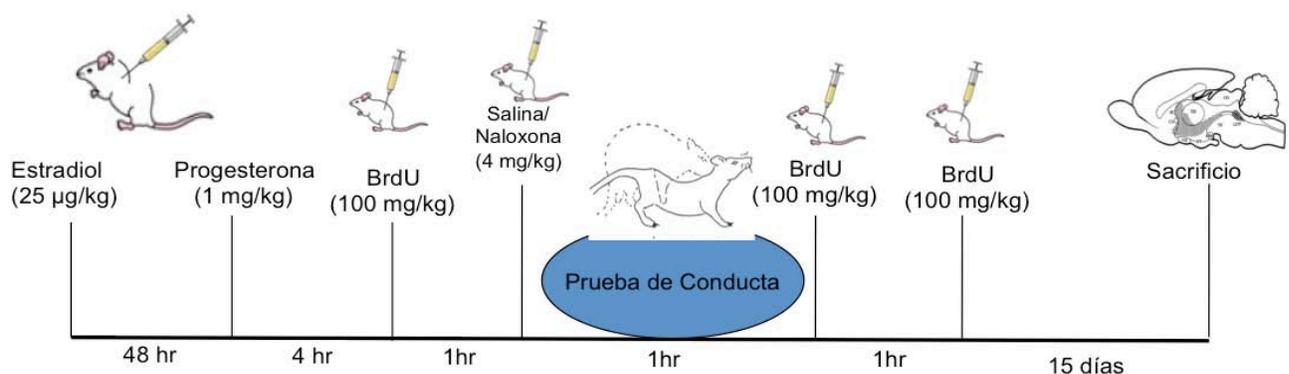


Figura 7. Cronograma experimental: Administración de hormonas, fármaco NX o salina, administración de BrdU, prueba de conducta y sacrificio.

2.7.3 Métodos

2.7.3.1 Pruebas de conducta sexual

En la prueba de conducta se inyectó intraperitonealmente NX (4mg/kg/ml) o solución salina y se colocaron en cajas de cópula (ver figura 8) un minuto antes de iniciar la conducta sexual. Las hembras se dividieron aleatoriamente en 5 grupos (Figura 8): 1) Control salina, 2) Control NX, 3) Cópula no regulada salina, 4) CR salina y 5) CR NX. En los dos primeros grupos las hembras recibieron una inyección de solución salina o NX, pero no fueron expuestas a la presencia de un macho (Figura 8, cuadro azul). En el tercer grupo se colocó a la hembra en una caja de cópula tradicional y fue inyectada con solución salina (Figura 8 cuadro rojo). En el grupo 4 y 5 (Figura 8, cuadro verde), la caja de cópula fue dividida con una separación de acrílico y en la base de la división tenía un orificio de 7 cm por donde la hembra, pero no el macho por ser de mayor tamaño, podía cruzar libremente y de esta manera la hembra tenía la facilidad de regular la interacción sexual y dependiendo el grupo al que pertenecían fueron inyectadas con solución salina o NX.



Figura 8. Fotos representativas de los grupos experimentales. Control salina o control NX (azul), cópula no regulada (rojo) y CR o CR con NX (verde).

Parámetros de conducta sexual

Durante la prueba de conducta sexual se registraron los siguientes parámetros: número de montas, intromisiones, eyaculaciones, latencias de monta, intromisión y eyaculación, latencias de regreso después de una monta y de una intromisión, porcentajes de salidas después de una monta, de una intromisión y de una eyaculación,

así como el coeficiente de lordosis, la intensidad media de lordosis e intervalo inter-intromisión.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos en las pruebas de conducta sexual fueron analizados empleando un análisis de varianza (ANDEVA). En caso de encontrar diferencias significativas entre los grupos se realizó la prueba *post hoc* de Fisher. Los datos del número de células reveladas por la técnica de IH, fueron analizados con una prueba ANDEVA y un *post hoc* de Fisher. Los datos del número de células revelados por la técnica de inmunofluorescencia (IF) fueron analizados con la prueba de Kruskal Wallis y posteriormente con una prueba U de Mann-Whitney para determinar las diferencias. Para el análisis del porcentaje de células positivas, se realizó un análisis de chi cuadrada.

2.7.3.2 Immunohistoquímica para BrdU

Obtención del tejido

Después de 15 días de que las hembras realizaran la prueba conductual, los animales recibieron una sobredosis de pentobarbital. Posteriormente, se perfundieron con una solución al 4% de paraformaldehído en 0.1 M de PBS para fijar los tejidos. Empleando una guillotina se cortó la cabeza, se removió el cerebro cuidando especialmente en no dañar los bulbos y se postfijaron por 1 h en una solución al 4% de paraformaldehído. Posteriormente los cerebros se cambiaron a solución de sacarosa al 30% por 3 días aproximadamente. Se realizaron cortes sagitales (30 μ) del hemisferio derecho del cerebro con un criostato, a nivel del BOP y del BOA.

Protocolo de immunohistoquímica para BrdU

Para detectar células positivas al marcador BrdU (Figura 9) se realizó IH por la técnica de flotación, en la cual los cortes se lavaron en TBS 0.1 M, pH 7.6 (Tris-buffered saline) y se fijaron en HCL 2 N (37 °C) por 60 min. Posteriormente se realizó bloqueo de

sitios inespecíficos mediante la incubación de los tejidos en soluciones de TBS, Tritón 10% (0.3%) y albúmina (0.1%) por 15 min. Se incubó el tejido por 16 h a 4 °C en anticuerpo primario: anti-BrdU monoclonal de ratón (1:2000), y después de una serie de lavados con TBS, albúmina 0.1 (1%) y T10x (0.02%) se incubaron nuevamente en anticuerpo secundario biotinilado: anti-ratón IgG (1:500) por 2 h. Se realizó una última incubación con TBS, T10x (0.32%) y ABC. La marca fue revelada con diaminobenzidina (DAB, 0.02%) y 0.01% H₂O₂ en 0.1 M TBS. Los cortes fueron montados cuidadosamente en portaobjetos empleando permount para cubrirlos.

Como control positivo se usaron tejidos cerebrales ratas a cuyas madres se les inyectó BrdU (300 mg/kg) durante la gestación en los días 13, 14 y 15.

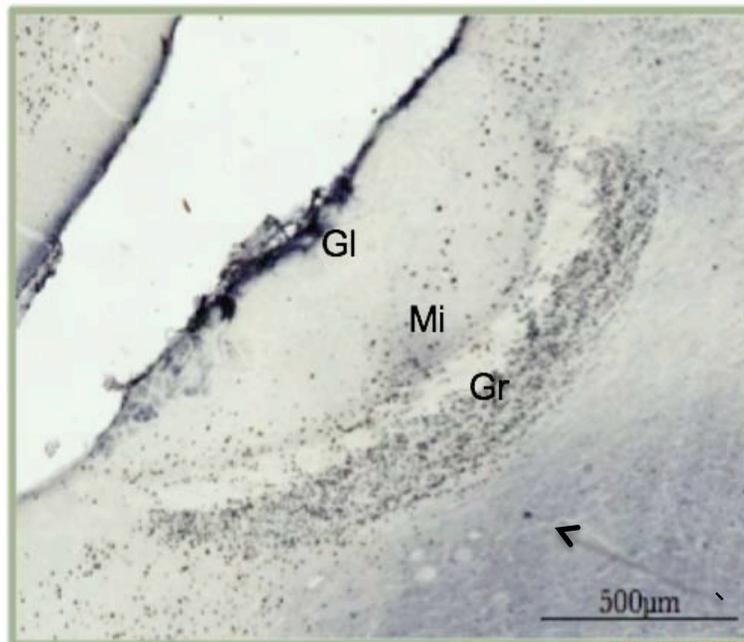


Figura 9. Foto representativa del BOA con sus diferentes capas Gl (glomerular) Mi (mitral) y Gr (granular) de una hembra que fue tratada con BrdU durante la gestación (control positivo) y en cuyo tejido se realizó IH para detectar BrdU. Se observan las células inmunorreactivas como pequeños puntos de color negro (ejemplo señalado con una flecha).

Cuantificación de células nuevas

La cuantificación y análisis de células nuevas se realizaron con un microscopio óptico *Olympus* (objetivo 10X) se tomaron una serie de imágenes para reconstruir el BO (Figuras 9 y 10) y con la ayuda del software Image Pro, se delimitaron áreas de interés

(AOI, Figura 10). En un estudio doble ciego, se cuantificaron las células IR BrdU de manera manual. El número de células que se obtuvo (4 cortes por sujeto) se sumó y promedió por sujeto, para después incluirlo en un análisis por grupo. Los resultados se muestran como densidad de células IR BrdU por mm^2 , lo cual se obtuvo calculando el área de cada AOI utilizado.

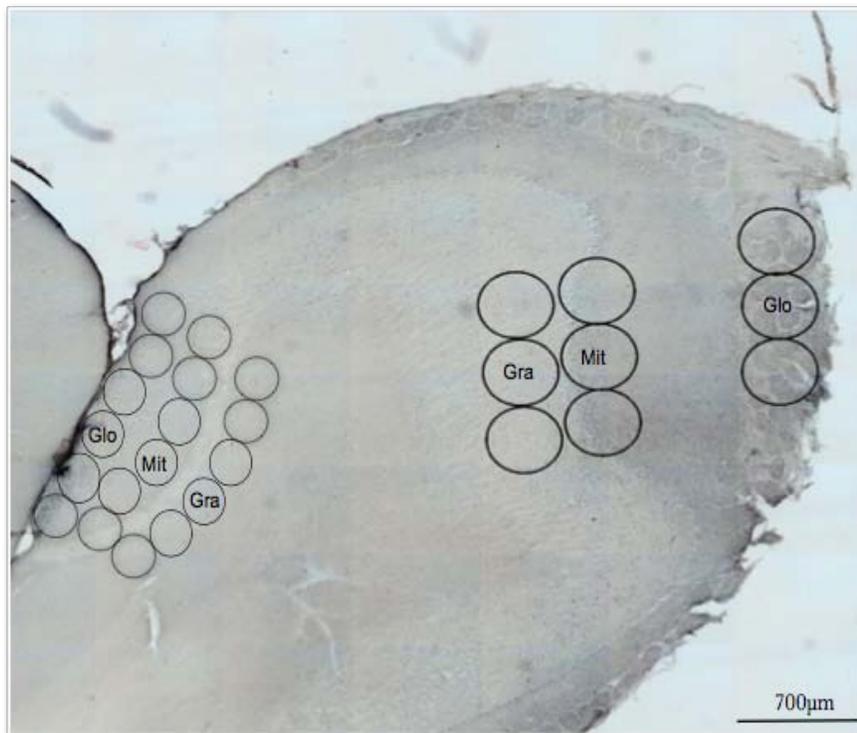


Figura 10. Reconstrucción de un corte sagital del BO, presentando las AOI (círculos) por capa del BOP y BOA en sus capas granular (Gra), glomerular (Glo) y mitral (Mi), en donde se cuantificaron las células IR BrdU.

2.7.3.2 Inmunofluorescencia para BrdU/NeuN/GFAP

Los tejidos se mantuvieron en constante agitación en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS 0.1M) para después permeabilizar las membranas celulares con lavados de borohidrato de sodio (.5%), Tritón 10X (1%) y H₂O₂ (1%). Los tejidos se incubaron en 2N HCL por 1 hora para abrir los núcleos celulares y permitir la incorporación del anticuerpo. Posteriormente, se realizó bloqueo de sitios inespecíficos mediante la incubación de los tejidos en soluciones de PBS, Tritón 10% (0.3%) y

albúmina (0.1%) por 15 min. Se incubó el tejido por 20 h a 4 °C en el anticuerpo primario (1:800) (anti-BrdU monoclonal de rata). Se realizó otra incubación con PBS, T10x. Después de una serie de lavados con PBS, albúmina 0.1 (1%) y T10x (0.02%), se incubaron nuevamente en PBS, T10x (0.32%) y ABC. Se utilizó un kit de amplificación (Coumarin System 1:100). Tras verificar la marca fluorescente de BRDU, se incubaron nuevamente en anticuerpo primario para NeuN (1:250) y se procedió a la amplificación en este caso con el sistema CY3 1:100. Tras verificar ambas marcas (BrdU y Neun), se incubó el anticuerpo primario para GFAP (1:500) y después su respectivo anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo Alexa 488 1:1250 (1:500) por 2 h. Por último se realizaron lavados con TBS y T10x (0.32%). Los cortes fueron montados cuidadosamente en portaobjetos empleando Acqua Poly/Mount (Polysciences, Inc. 633008) y se mantuvieron a 4°C y protegidos de la luz hasta su análisis (Figura 11).

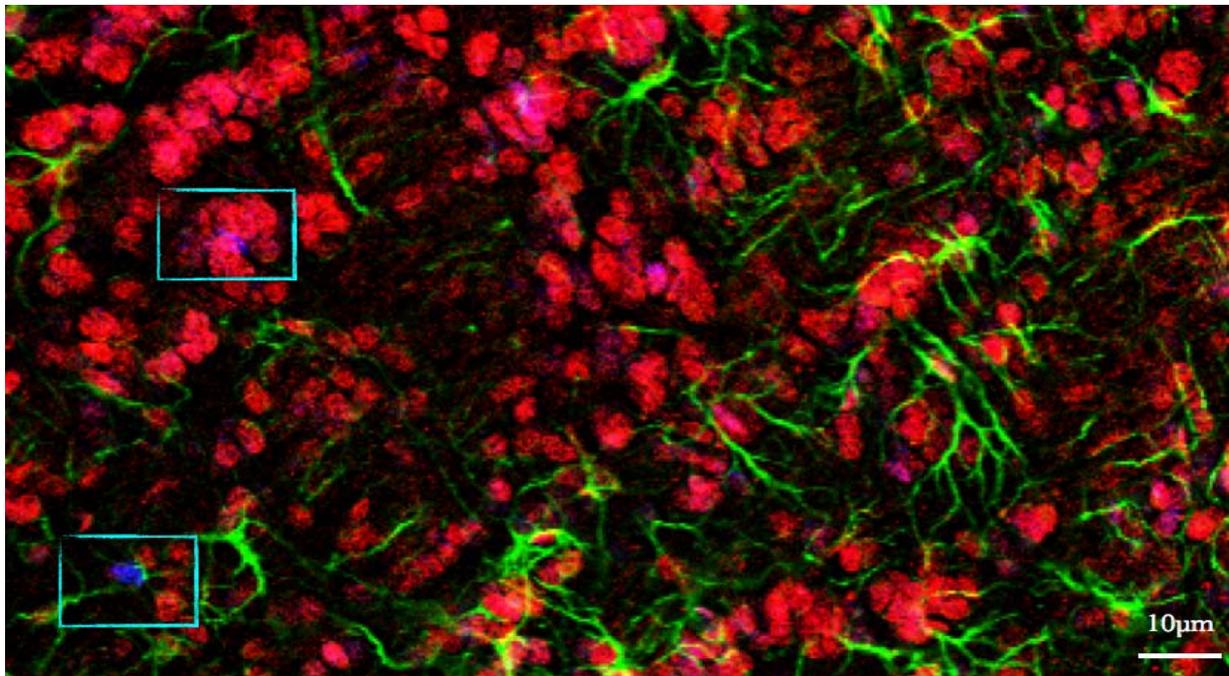


Figura 11. Foto representativa del triple marcaje en donde se observan astrocitos (verde), neuronas (rojo), y células marcadas con BrdU (azul). Dentro del recuadro superior se observa un doble marcaje de neurona con BrdU y en el cuadro inferior un doble marcaje de astrocito con BrdU.

Cuantificación de células con doble marcaje (IR BrdU+NeuN o BrdU+GFAP)

Se identificaron células marcadas por fluorescencia con un microscopio confocal *ZEISS LSM 700* (objetivo 20X), con tres canales activos; verde, rojo y azul (Figura 11,12 y 13 A-D). Se realizó una reconstrucción de la parte anterior de la capa granular del BOA (Figura 12) y por tejido se obtuvo un stock de 9 rebanadas ópticas de 2 μm en plano Z. Para la cuantificación, se utilizaron 3 AOI de 200 μm y se determinó el número de células IR, el cual se consideró como el 100%. A partir de este se determinó el porcentaje de células marcadas tanto IR BrdU+NeuN como IR BrdU+GFAP. Para confirmar la colocalización de los marcadores y determinar el doble marcaje, se utilizó el corte ortogonal (Figura 13 E) en algunos casos y se verificó con la colocalización con el procesamiento en tercera dimensión (Figura 13 F).

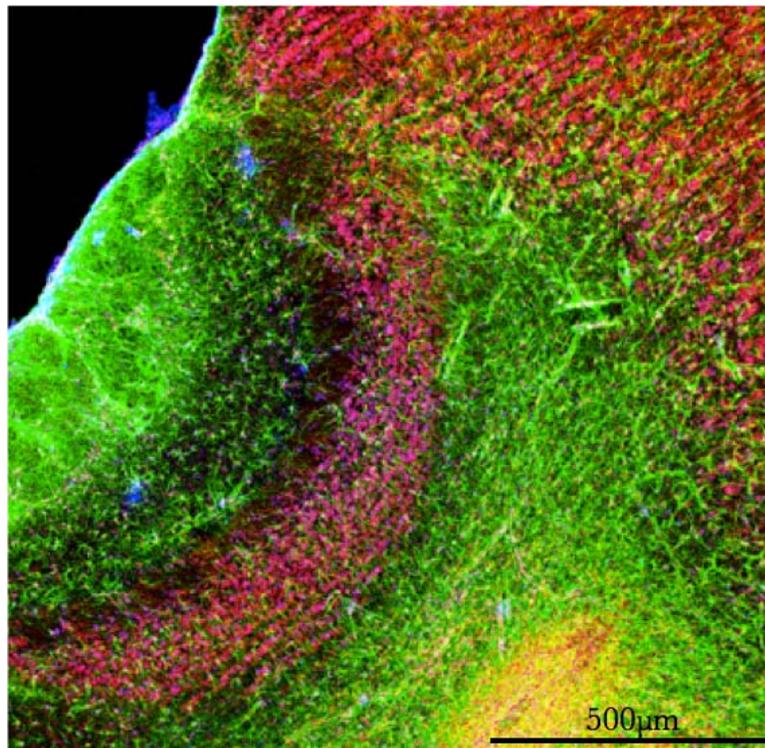


Figura 12. Fotografía tomada con el objetivo 20x y con un total de 6x7 cuadros en donde se puede apreciar una reconstrucción de un corte sagital de un BOA tratado con IF para NeuN (rojo), GFAP (verde) y BrdU (azul).

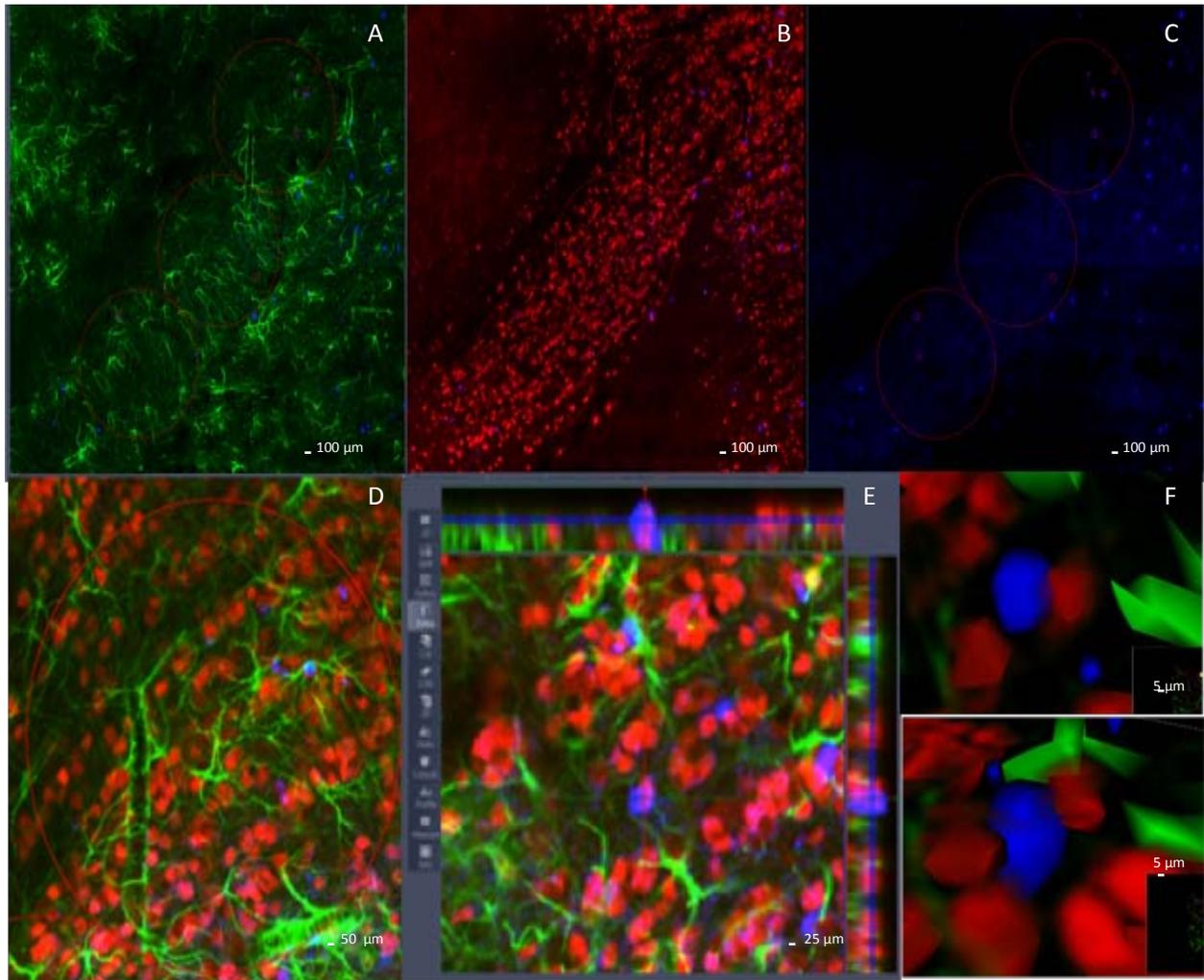


Figura 13. Adquisición de las imágenes por medio de microscopía confocal. A) Canal verde, células IR GFAP. B) Canal rojo, células IR NeuN. C) Canal azul, células IR BrdU. D) Tres canales activos y un acercamiento a un AOI. E) Corte ortogonal para confirmar colocalización. F) Procesamiento en 3D para verificar doble marcaje.

3. Resultados

3.1 Parámetros de conducta sexual

Como se observa en la tabla 2, el grupo de cópula no regulada recibió un mayor número de montas ($F(2,28) = 7.356$, $p = 0.0027$), e intromisiones ($F(2,28) = 14.669$, $p < 0.0001$), que los grupos de CR. En los demás parámetros no se observaron diferencias significativas. Los datos sugieren que la administración de naloxona no tiene un efecto sobre la ejecución de la conducta sexual en las hembras de ese grupo.

Parámetros	Cópula regulada Salina n=10	Cópula regulada Naloxona n=10	Cópula no regulada n=10
Machos			
Montas	11.6 ± 3.0	19.6 ± 2.7	37.3 ± 7.1 *
Intromisiones	21.5 ± 1.6	17.2 ± 1.4	35.5 ± 3.6 *
Eyaculaciones	2.7 ± 0.4	2.0 ± 0.4	3.1 ± 0.4
Latencia de monta	106.7 ± 23.3	178.0 ± 49.3	445.5 ± 170.8
Latencia de intromisión	146.6 ± 47.3	249.7 ± 65.7	207.2 ± 102.0
Latencia de eyacuación	1212.7 ± 203.8	972.6 ± 181.8	1488.1 ± 324.1
Hembras			
III	57.7 ± 20.3	84.6 ± 5.7	50.3 ± 4.3
CL	100 0	99.89 ± .2	99.8 ± .8
IML	1.8 ± .1	1.8 ± .03	1.8 ± .1
LRM	20.9 ± 4.12	33.3 ± 8.3	-
LRI	81.7 ± 15.7	223.0 ± 105.2	-
%SDM	56.7 ± 10.3	50.5 ± 9.3	-
%SDI	78.3 ± 5.7	67.5 ± 6.5	-

Tabla 2. Parámetros de conducta sexual de los tres grupos: CR por la hembra tratada con salina, CR por la hembra tratada con NX y cópula no regulada. III (intervalo inter-intromisión), CL (coeficiente de lordosis), IML (intensidad media de lordosis), LRM (latencia de regreso después de la monta), LRI (latencia de regreso después de la intromisión), %SDM (porcentaje de salida después de la monta), %SDI (porcentaje de salida después de la intromisión). Los datos se expresan como media y el error estándar. * $p < 0.05$ de los grupos de cópula regulada respecto al grupo de cópula no regulada.

3.2 Cuantificación de células inmunorreactivas a BrdU en el BOP

En el BOP no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de células inmunorreactivas en ninguna de las tres capas (Figura 15).

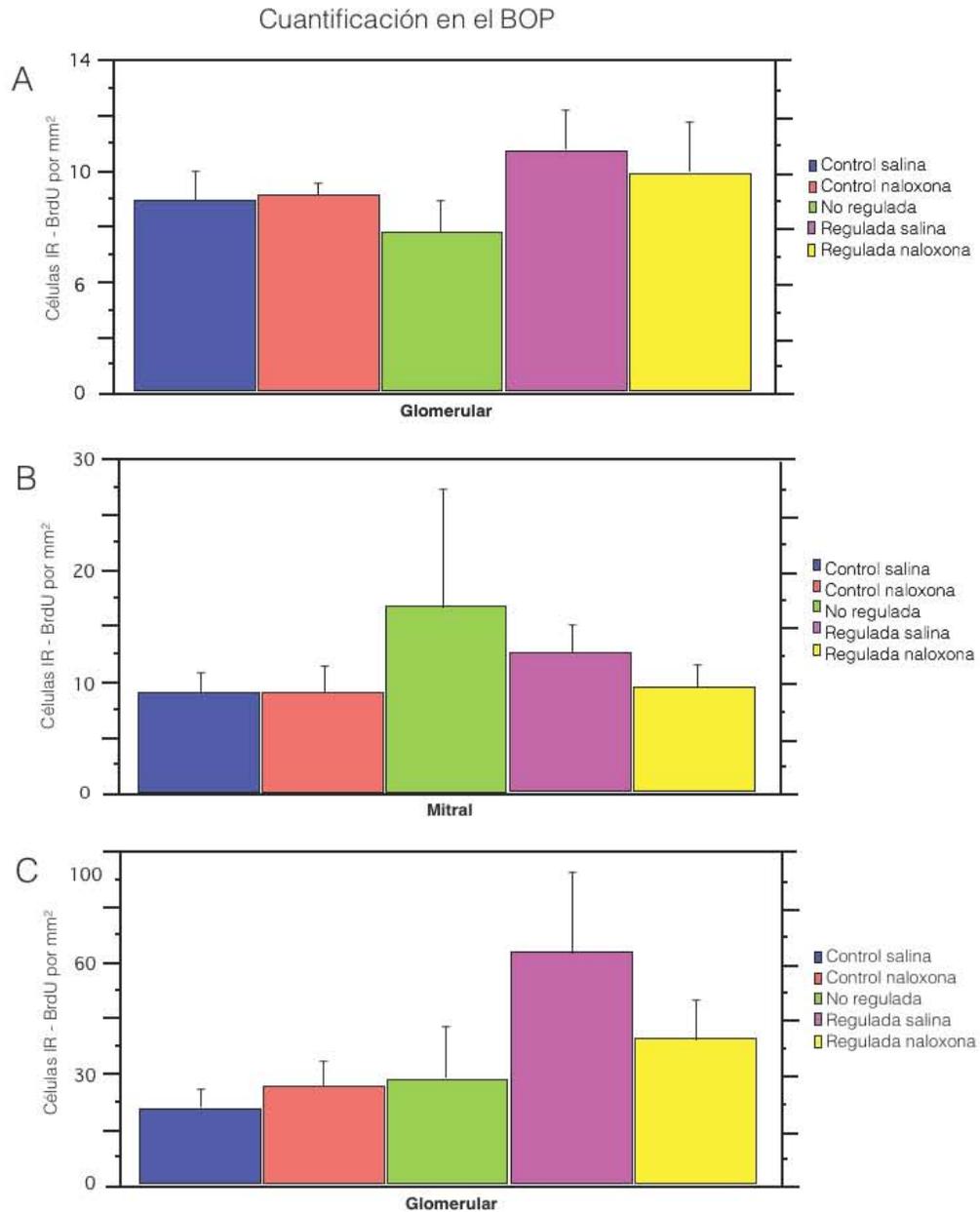


Figura 14. Número de células inmunorreactivas por mm² en la capa glomerular, mitral y granular del BOP. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba realizada (ANDEVA).

3.3 Cuantificación de células inmunorreactivas a BrdU en el BOA

En el BOA se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de células IR en la capa granular anterior ($F_{(4,34)}=5.266$, $p=.0021$) (Figura 14 C). La prueba *post-hoc* de Fisher mostró que el número de células IR BrdU en hembras que regularon la cópula fue mayor con respecto a los demás grupos. También podemos observar que la NX bloqueó este incremento en el número de células IR BrdU de aquellas hembras que regularon la cópula pero fueron inyectadas con este fármaco. Cada grupo está integrado por 8 sujetos, excepto el control NX que tiene 7. No encontramos diferencias significativas en la capa glomerular o mitral del BOA.

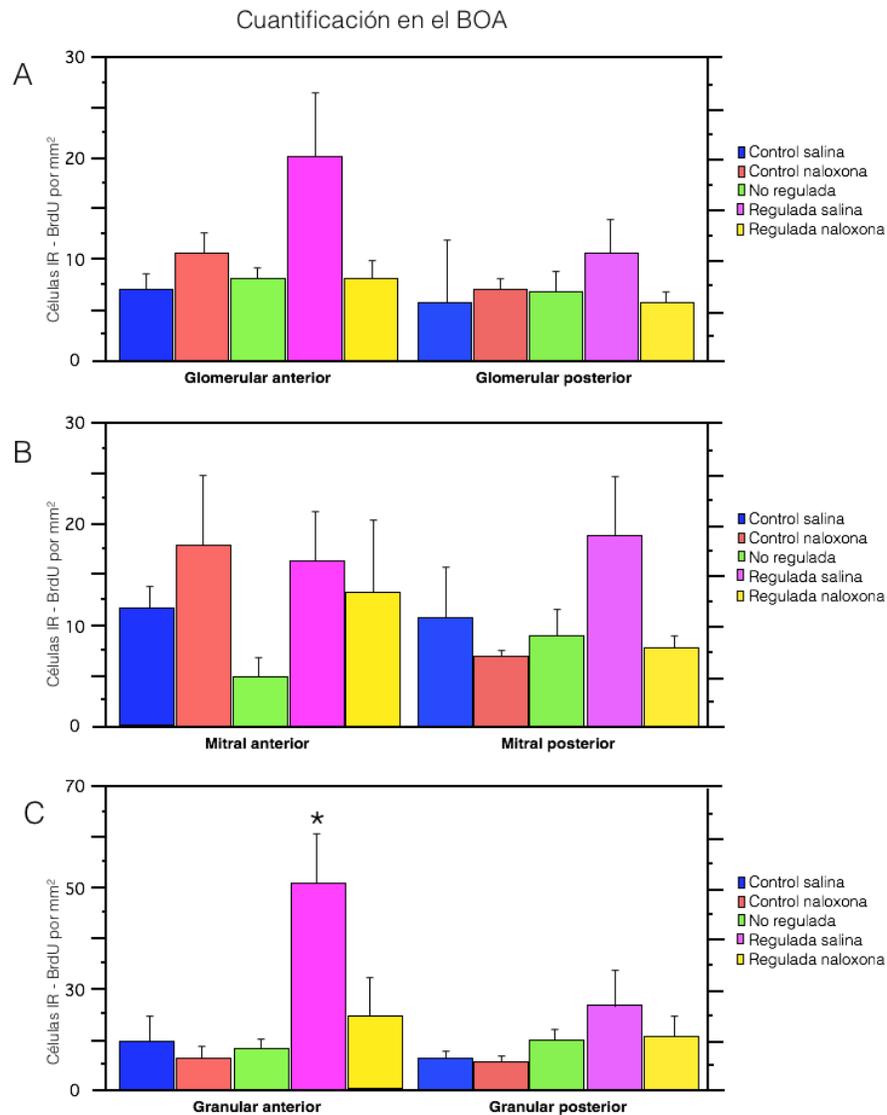


Figura 15. Número de células IR por mm^2 en la capa glomerular (A), mitral (B) y granular (C) del BOA en sus partes anterior y posterior. * $p < 0.01$ respecto a los demás grupos (Post hoc Fischer).

3.4 Cuantificación de células inmunorreactivas a BrdU, GFAP y NeuN en el BOA

Se realizó un conteo del número de células nuevas IR BrdU en la capa granular anterior del BOA, así como los dobles marcajes; NeuN + BrdU y GFAP + BrdU (Figura 16). Se consideró como el 100% las células IR BrdU y se determinaron los porcentajes de células IR BrdU, IR GFAP o IR NeuN (Figura 16).

Los resultados y análisis estadístico (Kruskal Wallis), arrojaron diferencias significativas en el número de células IR BrdU (K-W: $H= 6.489$, $p < 0.05$) y utilizando una prueba U de Mann Withney, las diferencias se encontraron entre el grupo que regula la cópula contra las hembras que regularon la cópula tratadas con NX ($p < 0.05$). Cada grupo está integrado por 3 sujetos.

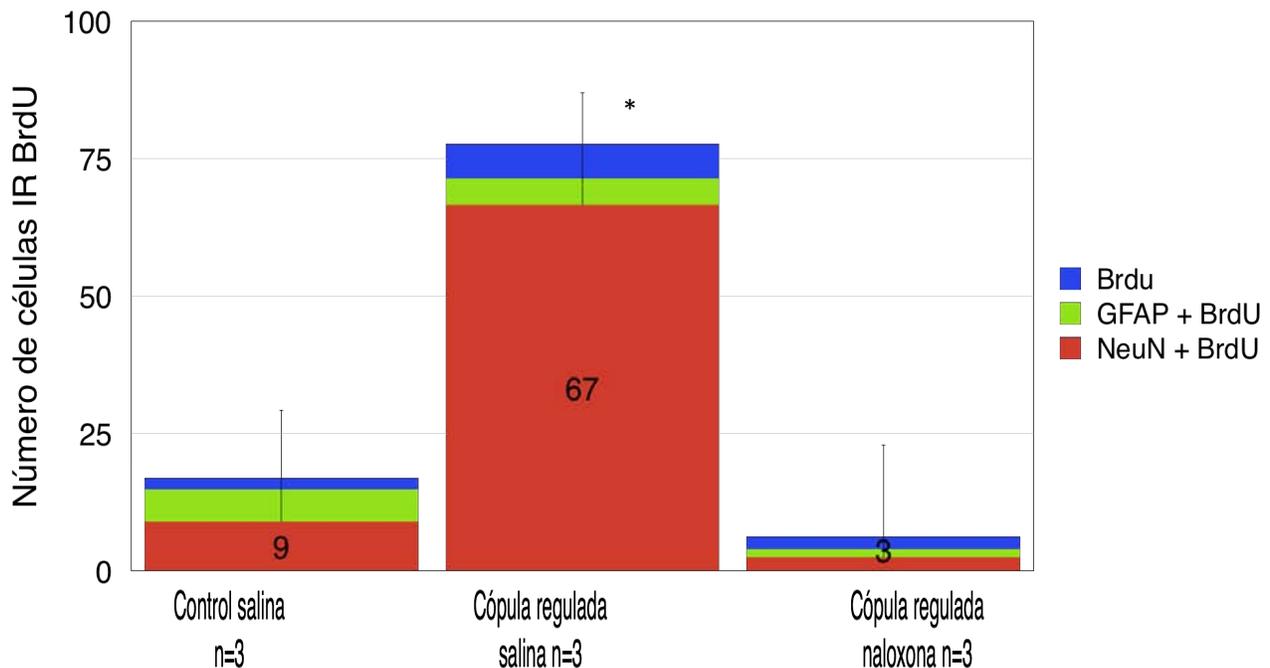


Figura 16. Número de células IR BrdU en la capa granular anterior del BOA (color azul), así como los dobles marcajes NeuN+BrdU (representados con número y color rojo) y GFAP+BrdU (color verde). Los datos se representan como la media y el error estándar, * $p < 0.05$ respecto al grupo de CR NX (Kruskal-Wallis).

3.5 Cuantificación de la proporción de células doblemente marcadas NeuN+BrdU o GFAP+BrdU en el BOA

Para el análisis de la proporción de nuevas neuronas, se definió la población total (100%), sumando el número de células IR BrdU y doblemente marcadas con BrdU+GFAP más células doblemente marcadas con NeuN+BrdU. Posteriormente se determinó el porcentaje de células doblemente marcadas con NeuN+BrdU dentro de la población total (Figura 17). Se realizó un análisis de chi cuadrada y se observó que aquellas hembras que regularon la cópula, incrementaron el porcentaje de células positivas para NeuN a diferencia del grupo control o CR tratadas con NX ($\chi^2_{(2)} = 40.145$, $p < .001$) (Figura 17). Lo cual sugiere, que la CR es una condición que incrementa la NG en el BOA y que la NX bloquea este incremento.

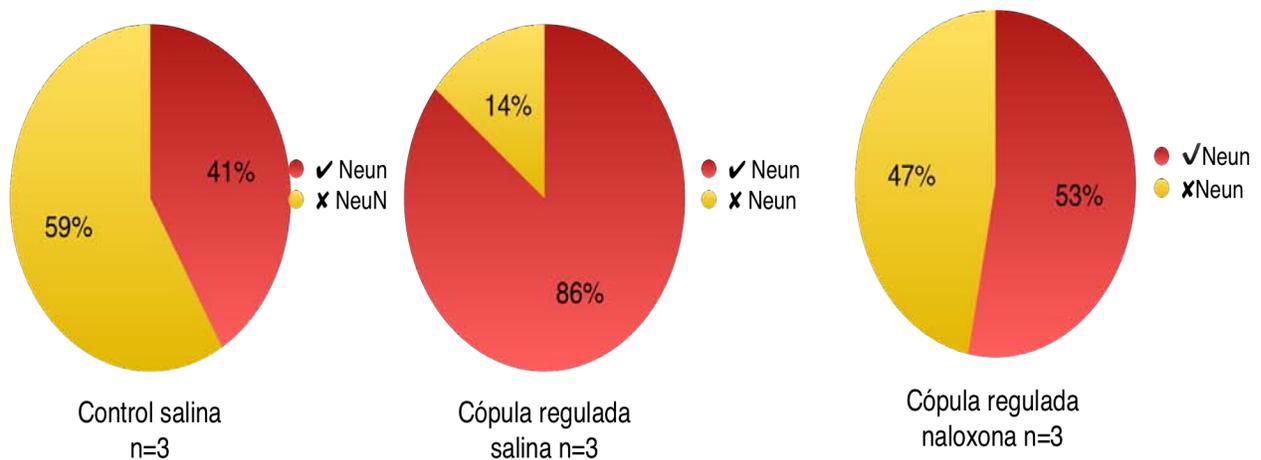


Figura 17. Porcentajes de células IR NeuN respecto a la suma de IR GFAP e IR BrdU en los tres grupos (Control salina, CR tratadas con salina y CR tratadas con NX.)

Para el análisis de la proporción de nuevos astrocitos, se definió la población total (100%), sumando el número de células doblemente marcadas con BrdU+NeuN más células doblemente marcadas con GFAP+BrdU. Posteriormente se determinó el porcentaje de células doblemente marcadas con GFAP+BrdU dentro de la población total (Figura 18) y así se determinó la proporción de fenotipo neuronal contra glial. En la Figura 18 podemos observar que si bien, las nuevas células adquieren diferentes fenotipos (glial y neuronal), el linaje neuronal es mayor en las hembras que regularon la

cópula y fueron tratadas con salina a diferencia de las hembras que fueron tratadas con NX, en las cuales se confirmó el bloqueo el incemento en la neurogénesis inducida por la CR (Figura 18).

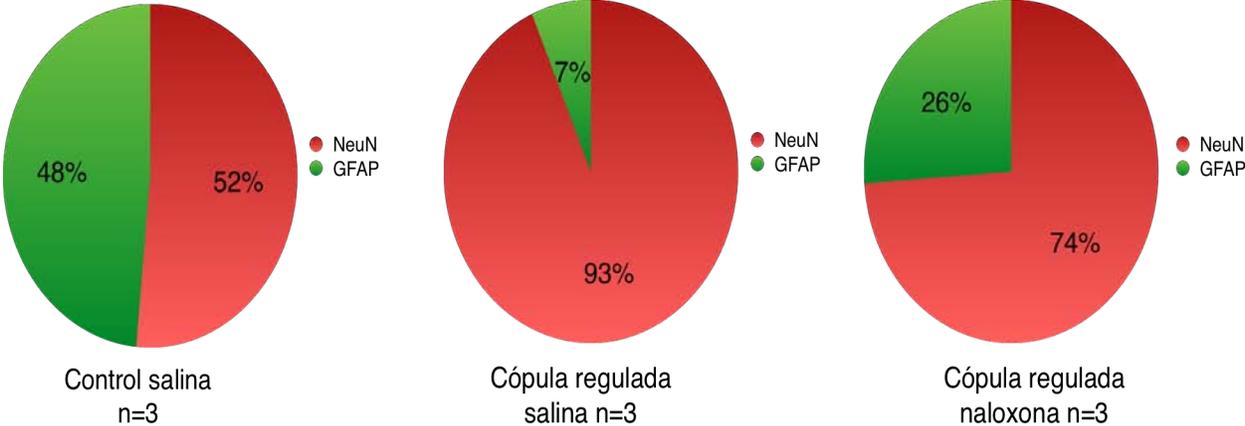


Figura 18. Porcentaje entre el número de células IR NeuN + BrdU y células IR GFAP + BrdU.

4. Discusión

4.1 Relación de la neurogénesis inducida por la cópula regulada y el sistema opioide

En el presente trabajo se evaluó si la NG inducida por la CR disminuye por la administración del fármaco NX. En primer lugar, los resultados obtenidos en el grupo de las hembras que regularon la cópula en comparación con los otros grupos es consistente con trabajos previos del laboratorio respecto al incremento en el número de células que se incorporan a los 15 días en hembras que regularon la cópula (Corona et al., 2011 y Arzate et al., 2013). Sin embargo, esto no sucedió en hembras que regularon la cópula pero que fueron inyectadas con NX antes de la prueba conductual, ya que la administración del fármaco NX, bloqueó el aumento en el número de nuevas células que se incorporaron al BOA, así como en el número de células que se comprometen a linaje neuronal. Esto sugiere una participación importante del sistema opioide, no sólo en cuestiones reforzantes de la cópula, sino en la modulación del proceso de NG en el BO de la rata hembra inducida por la CR. Siendo éste el primer estudio en donde se relaciona la CR, el sistema opioide y su impacto en la NG del BOA.

En lo referente a la modulación de la NG, se han estudiado factores tanto endógenos como exógenos, que tienen implicaciones directas en los diversos nichos neurogénicos utilizando aproximaciones farmacológicas, para evaluar neurotransmisores, hormonas y factores de crecimiento. Por ejemplo, se ha demostrado que el estradiol, la prolactina, el BDNF y el VEGF regulan a la alza la proliferación celular, mientras que la corticoesterona, la dopamina, la acetilcolina y el glutamato la regulan a la baja (Ming et al., 2005). En relación con el sistema opioide, se han descrito protocolos que incrementan la liberación de opioides endógenos como la cópula (Agmo et al., 1999, García-Horsmann et al., 2008) o el ejercicio voluntario (van Praag et al., 2002), los cuales se han correlacionado con cambios plásticos como un incremento en la NG.

Para determinar el papel del sistema opioide en la modulación de la NG, se han utilizado diversas aproximaciones experimentales como estudios *in vitro* de cultivos de precursores neuronales y estudios *in vivo*. Por ejemplo, en los años 90, diversos estudios *in vitro*, demostraron que los opioides endógenos sirven como inhibidores tróficos naturales afectando tanto mitosis y síntesis de ADN en el cerebro en desarrollo (Zagon et al., 1992). Además, se ha demostrado que la activación del receptor μ inhibe la proliferación celular y que el receptor δ inhibe la diferenciación neuronal (Eisch et al., 2000, Hauser et al., 2000, Reznikov et al., 1999). En otro estudio en cultivos celulares de cerebro fetal de rata, Barg y colaboradores (1993), demostraron que la β -endorfina en concentraciones fisiológicas decreta la incorporación de timidina al ADN, y este efecto es revertido con el uso de CTOP (antagonista del receptor μ). Contrario a esto, Persson y colaboradores (2003) administraron NX y observaron un efecto antiproliferativo en cultivos neuronales de células hipocámpales y el mecanismo propuesto es la baja actividad de los opioides endógenos sobre sus receptores, así como un decremento en la señalización de estos receptores por medio de una reducción en la producción de segundos mensajeros.

De manera complementaria, el grupo de Al-Hasani (2011), al observar un decremento en actividad del receptor, proponen que la vía afectada (MAPK), está involucrada en la regulación de actividades celulares como proliferación o síntesis de factores de transcripción (Al-Hasani et al., 2011). Estos estudios, aparentemente contradictorios, prueban que dependiendo la edad (tejido embrionario vs células progenitoras de adulto), dosis (fisiológicas vs suprafisiológicas), tipo celular afectado (neuronas, precursores o glía), tiempo de exposición (aguda vs crónica) y vía de señalización es el efecto final sobre las funciones celulares (Hauser et al., 1998).

En estudios *in vivo*, utilizando modelos *knockout*, se ha demostrado que el receptor μ modula la NG en el hipocampo, así como también su ligado endógeno, la β -endorfina (Kolodziej et al., 2008). Específicamente, el grupo de Blecheva (2001), demostró que tras la activación del receptor μ , se incrementa la fosforilación de ERK1/2, que activa factores de transcripción, aumentando la expresión de genes que permiten

que la célula entre en la fase S del ciclo celular (Al-Hasani et al., 2001, Persson et al., 2003, Belcheva et al., 2001). Esta modulación parece ser sensible a las condiciones de estimulación del receptor tanto crónicas como agudas y en un estudio de células hipocámpales (Eisch et al., 2006), la activación crónica, pero no aguda, de los receptores tipo μ correlaciona con un decremento en plasticidad estructural y NG en el hipocampo (Lutz et al., 2013). La explicación de las diferencias entre los tratamientos crónicos o agudos está altamente relacionada con los mecanismos de tolerancia tras la exposición repetida a opioides exógenos a niveles moleculares, celulares y sistémicos (Gurwell et al., 2001).

Además de considerar como un factor los tratamientos crónicos o agudos, las diferentes dosis utilizadas, pueden dar cuenta de diferencias importantes. Por ejemplo, en un estudio en donde se utilizaron pájaros pinzones (Khurshid et al., 2010) se observó que en cultivos celulares de la zona ventricular, tratados con una dosis de 10 μ M de NX, incrementó el número de células IR BrdU y la administración de met-enkefalina, decrementó éste número. Sin embargo, cuando administraron NX sistémicamente (intraperitonealmente) en una concentración de 2.5 mg/kg, se indujo un aumento en la proliferación celular (IR BrdU) tanto en machos como en hembras. Sin embargo, utilizando una concentración de 5 mg/kg y 10 mg/kg, se bloqueó este efecto. Dichos resultados son consistentes con lo observado en el presente trabajo, ya que nosotros administramos NX en forma aguda y en una baja concentración (4mg/kg), y tampoco observamos un incremento en el número de células IR BrdU. Por lo que es importante recordar que el mismo fármaco puede tener diferentes efectos dependiendo de la dosis utilizada.

Otro factor importante a considerar en nuestro estudio, son los diversos blancos moleculares de la NX y su papel como un fármaco neuroprotector mediado por células no neuronales y por activaciones independientes de receptores para opioides. Por ejemplo, se ha descrito la interacción de la NX con la microglía. Una hipótesis es que tras una manipulación experimental proinflamatoria, la microglía incrementa la producción de sustancias citotóxicas como el factor de necrosis tumoral α (TNF α) o IL-

1 β , y se ha demostrado que la NX es efectiva en la reducción de la producción de dichos factores por la microglía (Liu et al., 2000a). La NX, también actúa como un modulador de la producción de especies reactivas de oxígeno (Chang et al., 2000), al interactuar con la subunidad catalítica de la enzima NADPH, mostrando así acciones independientes de los sitios de acción para opioides (Wang et al., 2012). El papel neuroprotector de la NX ha sido corroborada manipulaciones como inducción isquemia cerebral (Liu et al., 2000c), daño en médula espinal e incluso en enfermedades neurodegenerativas (Hong et al., 2009).

También se sabe que la NX puede actuar como un modulador del sistema catecolaminérgico al modular la expresión de receptores en neuronas dopaminérgicas o GABAérgicas (Ostrowski et al., 1995), lo cual en el caso de hiperactivación del sistema catecolaminérgico como resultado de insultos ambientales al sistema nervioso, decrementando el número de receptores dopaminérgicos y evitando así la degeneración de la sustancia nigra en ratas (Liu et al., 2000c). Finalmente, existe evidencia de que la NX actúa en fenotipos celulares no relacionados con el sistema nervioso como el sistema inmune.

Dado lo anterior, es importante considerar, que la NX interactúa con receptores no opioides, organelos celulares o directamente con vías de señalización. Por lo que una manera de clarificar las consecuencias del sistema opioide en la NG, debería incluir es el uso de agonistas o antagonistas más selectivos, así como el estudio de vías de señalización involucradas en proliferación celular, diferenciación neuronal y muerte celular activadas por fenotipos no neuronales y mecanismos independientes de receptores opioides, pero que son sensibles a NX. Estudios posteriores deberán evaluar si otros mecanismos además de los opioides modulan la NG del BO inducida por la CR.

4.2 Comparación entre la cópula regulada y otras manipulaciones experimentales que favorecen la neurogénesis

Con este trabajo, queda bien establecido que las hembras son capaces de discriminar entre diferentes tipos de estimulación sexual por ejemplo entre CR y no regulada. Esto se ve reflejado tanto en los aspectos motivacionales, donde la CR induce estados afectivos positivos (placenteros) (Paredes et al., 1999) así como en cambios plásticos observados como la inducción de un incremento en la NG en el BO tanto en hembras (Corona et al., 2011) como en machos (Portillo et al., 2012). Lo cual sugiere que la CR favorece cambios plásticos en BO.

A pesar de que existen mecanismos que pueden ser similares en la modulación de la neurogénesis en el adulto, se ha sugerido que los eventos que favorecen la NG en el hipocampo no son los mismos para la NG en el BO (Rocheffort et al., 2002). Esto fue descrito por Brown y colaboradores (2003), en donde los paradigmas de ejercicio voluntario o enriquecimiento ambiental a diferencia de un incremento en el número de nuevas células en el hipocampo, no tuvieron efecto en la ZSV o BO, y por otro lado, un paradigma de enriquecimiento de olores, parece no tener impacto en el incremento de las nuevas células que se incorporan al hipocampo (van Praag et al., 1999).

Esto resulta interesante, ya que a pesar de contar con un mecanismo común en la modulación de la NG por el sistema opioide, la afinidad de unión de los receptores del sistema opioide y la consecuente activación de proteínas G ocurre diferencialmente dependiendo del estímulo sensorial presentado, la región del encéfalo estudiada y la expresión diferencial de receptores los diversos receptores en en el sistema nervioso y la cantidad de opioides endógenos secretados (Lutz et al., 2015)

Esta idea fue llevada a experimentación por Arida y colaboradores (2015), utilizando el modelo de ejercicio voluntario, en donde demostraron que el factor importante en este paradigma no es la cantidad de ejercicio realizado, sino la calidad del mismo (no aversivo), lo que propicia una mayor activación de receptores distribuidos

de manera diferencial en ciertas estructuras centrales (Arida et al., 2015). Esto en relación con los estudios presentados anteriormente con el *knockout* para β -endorfina, en donde se demuestra que este ligando participa en la modulación de la NG en el hipocampo, se complementa con un trabajo realizado por el grupo de Pierce (1994) en humanos, en el cual se demostró que el ejercicio de resistencia, en comparación con el ejercicio aeróbico, decrementa la cantidad de β -endorfina circulante (Pierce et al., 1994).

En el caso del incremento de la NG reportada en el BOA como consecuencia de la CR a diferencia de la cópula no regulada, son las diferencias en la estimulación sensorial, las cuales podrían dar cuenta de expresiones locales de factores tróficos (Branchi et al., 2006) o neurohormonas (Okamoto et al., 2012) bien conocidas como reguladoras de proliferación celular, migración y supervivencia que tienen acciones diferenciales de acuerdo a la zona del encéfalo en la que se expresan (Takashi et al., 1999). En este sentido, la estimulación sexual favorece la producción de opioides endógenos que regulan circuitos locales o estructuras específicas de manera diferencial en el encéfalo en estructuras relevantes para la conducta sexual tal y como fue demostrado en un trabajo previo del laboratorio por García-Horsmann (2008). En este estudio, se administró NX de manera local (inyecciones intracerebrales) en estructuras relacionadas con la conducta sexual como el hipotálamo ventromedial (HVM), amígdala (AMG) y área preóptica media (APM), así como el núcleo accumbens (involucrado en el circuito de recompensa), y se demostró que los opioides endógenos y su interacción con sus receptores son indispensables para que se establezca el estado afectivo positivo exclusivamente en estructuras relacionadas con la conducta sexual (HVM, AMP y AMG) y que no son necesarios en el núcleo accumbens para el estado afectivo positivo (García-Horsmann et al., 2008).

A manera de resumen, tanto para la CR por la hembra como para el paradigma de ejercicio voluntario, se podría especular sobre la relación de éstos como eventos que tienen una relación con el sistema opioide endógeno, establecen estados afectivos positivos y favorecen la NG. Sin embargo, aunque comparten mecanismos similares

mediados por péptidos opioides en el incremento de la proliferación e incorporación de nuevas células, la modulación así como el papel que pueden jugar estas nuevas células es diferente, por lo que describiré a continuación, el posible papel que juegan las nuevas células del BO.

4.3 La importancia de la neurogénesis del bulbo olfatorio

Es importante resaltar que existen actualmente muchos estudios que describen de manera muy detallada el proceso de la NG en el adulto, como un proceso altamente conservado entre diversas especies, desde aves hasta mamíferos (Oboti et al., 2011). Actualmente, las descripciones de dicho fenómeno son realizadas a la luz de la búsqueda del impacto de las nuevas células en conjunto con el sistema al que se incorporan y es así como además de la expresión de la NG en el cerebro adulto es importante dar cuenta de sus papeles funcionales. Un claro ejemplo fueron los estudios de Nottebohm, quien demostró que las nuevas células tenían un papel importante en el aprendizaje del canto estacional en aves (Nottebohm 1989, 2002 y 2004), necesario para la reproducción sexual y consecuente preservación de la especie. Con estas evidencias, se le ha atribuido a la NG una gran relevancia biológica. Además de encontrar implicaciones en biología de células madre, neurobiología del desarrollo y plasticidad neuronal, se ha tratado de extrapolar dichos fenómenos al estudio de mecanismos afectados en enfermedades neurodegenerativas.

En comparación con la NG del hipocampo, en la cual se ha descrito que ciertas condiciones como el enriquecimiento ambiental y el ejercicio voluntario, aumentan la proliferación celular y supervivencia neuronal en el giro dentado del hipocampo (Kepperman et al., 1997) y que esto correlaciona con modificaciones en el aprendizaje y la memoria, son pocos los estudios que han podido generalizar esta relevancia al papel que juegan las nuevas células en el BO tanto accesorio como principal (Oboti et al., 2011).

Sin embargo, el sistema olfatorio de los mamíferos es un modelo muy interesante y completo, ya que nos permite estudiar diversos aspectos de fisiología neuronal desde la etapa embrionaria hasta el remodelado de redes en el cerebro adulto (Oboti et al., 2011). Específicamente se sabe que este sistema es altamente plástico desde la periferia (neuronas olfatorias) y el BO, el cual es el sitio de mayor neurógenesis en el adulto y diferenciación neuronal. Este sistema es muy dinámico, ya que es posible que exista un aumento en el número de neuronas olfatorias o disminución dependiendo el contexto como se ha demostrado en estudios de privación de olores comparados con los de enriquecimiento de olores (Kolb et al., 1998). A pesar de esto, las especulaciones giran en torno al posible papel en respuestas desencadenadas por estímulos olfativos como olores del ambiente o sociales.

De acuerdo a los datos presentados en este trabajo, el incremento en el número de células que se observó en la capa granular del BOA. En esta capa, se incorporan interneuronas tanto en la capa granular como en la capa periglomerular, las cuales se espera que hagan sinapsis dendro-dendríticas con células mitrales o empenachadas (Shepherd et al. 2004). Sugerimos que este proceso puede estar modulado por la señalización opioide y posiblemente por otros blancos moleculares de NX. Las diferencias entre la capa granular anterior y posterior es un claro ejemplo de diferencias a nivel del procesamiento sensorial en el BOA, en donde la zona anterior tiene zonas restringidas al procesamiento de diversas feromonas. De manera muy general se sabe que la región posterior es activada cuando se procesa un olor social, por ejemplo un miembro de la misma especie o depredadores, y la anterior ante un olor sexualmente relevante. Un incremento en el número de células nuevas en la región posterior del BOA podría sugerir su participación futura en cuestiones reproductivas al continuar con su vía y activar áreas específicas del hipotálamo que ayudarán al despliegue de la conducta apropiada (Kumar et al., 1999). Esta afirmación es apoyada por estudios recientes del laboratorio, en los cuales se demostró que las células IR BrdU, colocalizan con el marcador de activación c-Fos, tras la exposición a un estímulo sexual (Corona et al., 2016).

Adicionalmente, otros estudios han evaluado el posible papel de las nuevas neuronas que se incorporan al BO por medio de registros electrofisiológicos (van Praag et al., 2002), trazado transináptico, marcadores de activación celular como c-Fos (Mohr et al., 2013), y todo esto en tres niveles; sinapsis individuales y células, circuitos neuronales y organismos completos (Ming et al., 2005). Por ejemplo, se demostró que la exposición a olores, mejora la discriminación olfativa, y se relaciona con un incremento en el índice de supervivencia de neuronas inhibitorias. Por otro lado, el bloqueo de la NG antes o durante el aprendizaje de olores, evita la mejora en la discriminación en pruebas posteriores (Moreno et al., 2009). Esto es consistente con el estudio de Feresteyn y colaboradores (2010), en donde tras la inhibición de la NG en el BO, se observaron interacciones sociales anormales, específicamente interacción con el macho pero no con las hembras, y se sugiere que es por la incapacidad para detectar o discriminar olores, en este caso, un olor sexualmente relevante. Esto concuerda con las observaciones de Mak y colaboradores (2007) en donde tras interacciones de un macho con sus crías, incrementa la NG en el BO e hipocampo del padre. Esto también ha sido reportado en otra especie de roedores (*prairie voles*) cuando son expuestos a sus crías (Ruscio et al., 2008).

Consideramos importante mencionar, que no todo cambio plástico tiene un impacto positivo en el cerebro adulto, ya que se ha demostrado que hay un marcado incremento de proliferación celular tanto en la ZSV como en la subgranular como consecuencia de condiciones patológicas como isquemia, epilepsia, inflamación, enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, Huntington) y diabetes (Ming et al., 2005). Además, los progenitores neuronales y tumores cerebrales comparten características como marcadores celulares (*nestina*, *bim-1*, *sox-2*), vías regulatorias de proliferación y supervivencia (*Shh*) (Oliver et al., 2004). Por lo que de cierta forma estudios comparativos de progenitores y células cancerígenas podrían dar cuenta del origen de la disfunción en dicha patología, por ejemplo, en un estudio de Zhao (2014) se reportó un incremento de NG asociado a cáncer de seno, pero este fenómeno se comparte con otros tipos de cáncer (Zhao et al., 2014).

Finalmente, cabe decir que el entendimiento de mecanismos básicos de plasticidad relacionados con la NG en el cerebro adulto, podría proveer estrategias para terapias en cuestiones de daño o enfermedades neurológicas (Ming et al., 2005b).

5. Conclusiones

Los datos presentados en este trabajo muestran que la NX decremента la NG en el BO de la rata hembra inducida por la CR, lo cual sugiere implicaciones del sistema opioide en la modulación de la NG en el BO tras la cópula regulada.

6. Perspectivas

Para complementar este trabajo, resulta interesante considerar la administración de naloxona en estructuras cerebrales relacionadas con la cópula en la rata hembra y que son necesarias para la inducción del estado afectivo positivo asociado a la CR como se describe en el estudio de García-Horsman (2008). En ese estudio se inyectó intracranealmente 5 µg/ml de NX en estructuras cerebrales relacionadas con la conducta sexual como el área preóptica medial, la amígdala o el hipotálamo ventromedial y demostró que la administración de NX en esas estructuras bloqueó el establecimiento del estado afectivo positivo, que se ha descrito a lo largo de este trabajo es dependiente de opioides.

Sin embargo, una manera de clarificar las consecuencias del sistema opioide en la NG, debería incluir el uso de agonistas o antagonistas más selectivos de receptores opioides o bien, fármacos relacionados con los mecanismos independientes del sistema opioide pero que son sensibles a NX. Esto permitiría determinar el papel de circuitos locales modulados tanto por opioides como por otros mecanismos que impactan en la NG del BO en hembras que regulan la cópula.

Finalmente, se han demostrado que los beneficios de manipulaciones experimentales como el acceso a ambientes enriquecidos o ejercicio voluntario,

favorecen la plasticidad cerebral e incrementan en la NG tanto del hipocampo como del BO con consecuencias en mejoras en el desempeño cognitivo (Vivar et al., 2013; Oboti et al., 2011). Sin embargo, no se ha probado si las nuevas células generadas por la cópula podrían tener un impacto en cuestiones cognitivas relacionadas o no con el sistema olfatorio, para lo cual, consideramos que probar la funcionalidad de éstas células, daría información sobre el papel que pudieran tener en la fisiología de los sistemas olfativos, fisiología de la reproducción, conducta materna y posibles alcances terapéuticos.

7. Referencias

- Agmo, A. (1999). Sexual motivation: An inquiry into events determining the occurrence of sexual behavior. *Behavioral Brain Research*, 5, 129-150.
- Al-Hasani, R., Bruchas, M. (2013). Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology*, 115 (6), 1363–1381.
- Altman, J. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *Journal of Comparative Neurology*, 124, 319-335.
- Altman, J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis; cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology*, 137, 433-458.
- Alvarez-Buylla A., Garcia-Verdugo, J.M. (2002). Neurogenesis in adult subventricular zone. *Journal of Neuroscience*, 22, 629–634.
- Arida, R.M., da Silva, S.G., Aparecido de Almeida, A., Cavalheiro, E.A, Zavala-Tecuapetla, C. Brand., S., Rocha, L. (2015). *Journal of Neurochemistry*, 132, 206–217.
- Argiolas, A. (1999). Neuropeptides and sexual behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 23, 1127–1142.
- Arguello, A.A., Harburg, G.C., Schonborn, J.R., Mandyamc, C.D., Yamaguchi, M., Eisch, A.J. (2008). Time course of morphine's effects on adult hippocampal subgranular zone reveals preferential inhibition of cells in S phase of the cell cycle and a subpopulation of immature neurons. *Neuroscience*, 11; 157(1), 70–79.
- Arzate, D.M, Portillo, W., Corona, R., Paredes, R.G. (2013). Repeated paced mating promotes the arrival of more newborn neurons in the main and accessory olfactory bulbs of adult female rats. *Neuroscience*, 232, 151–60.

- Bakker, J. (2003). Sexual differentiation of the neuroendocrine mechanisms regulating mate recognition in mammals. *Journal of Neuroendocrinology*, 15, 615–625.
- Barg, J., Belcheva, M., McHale, R., Levy, R., Vogel, Z., Coscia, C. (2013). β -Endorphin is a potent inhibitor of thymidine incorporation into dna via μ - and κ -opioid receptors in fetal rat brain cell aggregates in culture. *Journal of Neurochemistry*, 60 (2), 765–767.
- Beach, F.A. (1976). Sexual attractivity, proceptivity, and receptivity. *Hormones and behavior*, 7, 105-138.
- Belcheva, M.M., Szucs, M., Wang, D., Sadee, W., Coscia, C.J. (2001). μ - Opioid receptor-mediated ERK activation involves calmodulin-dependent epidermal growth factor receptor transactivation. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 3384-33853.
- Begg, A.C., Hofland, I., Van Der Pavert, I., Van Der Schueren, B., Haustermans, K. (2000). Use of thymidine analogues to indicate vascular perfusion in tumours. *Breast human cancer*, 83, 899–905.
- Branchi, I. (2006). Early social enrichment shapes social behavior and nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor levels in the adult mouse brain. *Biological Psychiatry*, 60 (7), 690–696.
- Brown, J., Cooper-Kuhn, C., Kempermann, G., Van Praag, H., Winkler, J., Gage, F., Kuhn, G. (2003). Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, 17, 2042-2046.
- Camacho, F., Sandoval, C., Paredes, R.G. (2004). Sexual experience and conditioned place preference in male rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 78, 419–425.
- Carroll, F.I., Lewin, A.H., Mascarella S.W. (2012). Designer drugs: a medicinal chemistry perspective. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1248, 18-38.

- Chang, C., Rota, C., Glover, R., Mason, R., Hong, J. (2000). A novel effect of an opioid receptor antagonist, naloxone, on the production of reactive oxygen species by microglia: a study by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Brain Research*, 854, 224–229.
- Cheng, W., Li, W., Hou, X., Zhang, N., Ma, I., Ding, F., Li, F., Miao, Z., Zhang, Y., Qi, Q., Li, G., Shen, L., Liu, J., Huang, W., Wang, Y. (2014). HSP60 is involved in the neuroprotective effects of naloxone. *Molecular Medicine Reports*, 10, 2172-2176.
- Corona, R., Larriva-Sahd, J., Paredes, R.G. (2011). Paced-mating increases the number of adult new born cells in the internal cellular (granular) layer of the accessory olfactory bulb. *PLoS One*, 6(5): e19380.
- Corona, R., Retana-Márquez, S., Portillo, W., Paredes, R.G. (2016). Sexual behavior increases cell proliferation in the rostral migratory stream and promotes the differentiation of the new cells into neurons in the accessory olfactory bulb of female rats. *Frontiers in Neuroscience*, 10:48.
- Dawan, B., Cesselin, F., Raghurir, R., Reisine, P, Bradeley, PB., Portoghese, P., Hamon, M. (1996). International Union pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacological Reviews*, 48 (4), 567- 592.
- Dowling, J., Isbister, G.K., Kirkpatrick, C.M. (2008). Population pharmacokinetics of intravenous, intramuscular, and intranasal naloxone in human volunteers. *The Drug Monitor*, 30, 490-496.
- Eisch, A.J., Barrot, M., Schad, C.A., Self, D.W., Nestler, E.J. (2000). Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Procedures of the National Academy of Sciences*, 97 (13), 7579–7584.
- Eckersell, C.B., Popper, P., Micevych, P.E. (1998). Estrogen-induced alteration of μ -opioid receptor immunoreactivity in the medial preoptic nucleus and medial amygdala. *Journal of Neuroscience*, 18, 3967–76.

- Emeterio, E.P., Tramullas, M., Hurle, M.A. (2006). Modulation of apoptosis in the mouse brain after morphine treatments and morphine withdrawal. *Journal of Neuroscience Research*, 83 (7), 1352-61.
- Eriksson, P.S. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Natural Medicine*, 4, 1313–1317.
- Erskine, M.S. (1985). Effects of paced coital stimulation on estrus duration in intact cycling rats and ovariectomized adrenalectomized hormone-primed rats. *Behavioral Neuroscience*, 99 (1), 151-161.
- Faden, A.L., Salzman, S. (1992) Pharmacological strategies in CNS trauma. *Trends in Pharmacology Science*, 13, 29-35.
- Fallis, R.J., Fisher, M., Lobo, R.A. (1984). A double blind trial of naloxone in the treatment of stroke. *Stroke*, 15, 627-629.
- Feresteyn, C., Lazarini, F., Wagne, S., Gabellec, M., de Chaumont, F., Marin, J.C., Boussi, F., Lledo, P.M., Gheusi, G. (2010). Disruption of adult neurogenesis in the olfactory bulb affects social interaction but not maternal behavior. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 4 (176), 1-17.
- Fichna, J., Janecka, A., Costentini, J., Rego, J.C. (2007). The endomorphin system and its evolving neurophysiological role. *Pharmacology Reviews*, 59 (1), 88–123.
- Garcia-Horsman, S.P., Agmo, A., Paredes, R.G. (2008). Infusions of naloxone into the medial preoptic area, ventromedial nucleus of the hypothalamus, and amygdala block conditioned place preference induced by paced mating behavior. *Hormones and behavior*, 54, 709-716.
- Georgiadis, J. R., Kringelbach, M. L., Pfaus, J. G. (2012). "Sex for fun: a synthesis of human and animal neurobiology". *Nature Reviews Urology*. 9 (9): 486–498.

- Greengard, P., Jen, J., Nairn, A.C., Stevens, C.F. (1991). Enhancement of the glutamate response by cAMP-dependent protein kinase in hippocampal neurons. *Science*, 253, 1135–1138.
- Gurwell, J., Nath, A., Sun, Q., Zhang, J., Martin, K., Chen, Y., Hauser, K. (2015). Synergistic neurotoxicity of opioids and human immunodeficiency virus-1 tat protein in striatal neurons in vitro. *Neuroscience*, 102 (3), 555–563.
- Hauser, K.F., Mangoura, D. (1998). Diversity of the endogenous opioid system in development: novel signal transduction translates multiple extracellular signals into neural cell growth and differentiation. *Perspectives in Developmental Neurobiology*, 5, 337–449.
- Hauser, K.F., Houdi, A.A., Turbek, C.S., Elde, R.P., Maxson, W. (2000). Opioids intrinsically inhibit the genesis of mouse cerebellar granule neuron precursors in vitro: differential impact of mu and delta receptor activation on proliferation and neurite elongation. *European Journal of Neuroscience*, 12 (4), 1281– 1293.
- Holmes, M. M., Galea, L. A. M. (2002). Defensive behavior and hippocampal cell proliferation: differential modulation by naltrexone during stress. *Behavioral Neuroscience*, 116, 160–168.
- Hutchinson, M., Bland S., Johnson K., Rice K., Maier S., Watkins L. (2007). Opioid-induced glial activation: mechanisms of activation and implications for opioid analgesia, dependence, and reward. *Scientific World Journal*, 7, 98-111.
- Hutchinson, M., Zhang, Y., Shridhar, M., Evans, J., Buchanan, M., Zhao, T., ... Watkins, L. (2010). Evidence that opioids may have toll-like receptor 4 and MD- 2 effects. *Brain Behavior Immunology*, 24, 83-95.
- Hong, R., Rota, C., Glover R., Mason, R., Hong, J.S. (2009). A novel effect of an opioid receptor antagonist, naloxone, on the production of reactive oxygen species by microglia: a study by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Brain Research*, 854, 224–229.

- Hoshino, T., Nagashima, T., Cho, K.G., Davis, R.L., Donegan, J., Slusarz, M., Wilson, C.B. (1989). Variability in the proliferative potential of human gliomas. *Journal of Neuro-Oncology*, 7, 137–143.
- Hughes, J., Beaumont, A., Fuentes, J. A., Malfroy, B., Unsworth, C. (1980). Opioid peptides: aspects of their origin, release and metabolism. *Journal of experimental biology*. 89, 339-255.
- Kahn, L., Alonso, G., Normand, E., Manzoni, O.J. (2005). Repeated morphine treatment alters polysialylated neural cell adhesion molecule, glutamate decarboxylase-67 expression and cell proliferation in the adult rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, 21 (2), 493–500.
- Kan, M.N., Chen, Y.T., Lee, A.Y. (1992). Naloxone reversal of ischemic arrhythmia is stereospecific and suggests role of endogenous opioid peptides in ischemic heart disease. *Proceedings of the Society Experimental Biology Medicine*, 200, 518-521.
- Kelliher, K.R., Baum, M.J. (2002). Effect of sex steroids and coital experience on ferrets' preference for the smell, sight and sound of conspecifics. *Physiological Behavior*, 76, 1 –7.
- Kent, M. (2000). *Advanced biology*. Oxford University Press. pp. 250–253. ISBN 978-0-19-914195-1.
- Kempermann, G., Kuhn, H.G., Gage, F.H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386 (6624), 493–495.
- Kempermann, G., Kuhn, H.G., Gage, F.H. (1998). Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *Journal of Neuroscience*, 18 (9), 3206–3212.
- Kolb, B., Wishaw, I.Q. (1998). Brain plasticity and behavior. *Annual Review Psychology*, 49, 43–64.

- Khurshid, N., Hameed, Mohanasundaram, S., Iyengar, S. (2010). Opioid modulation of cell proliferation in the ventricular zone of adult zebra finches (*Taenopygia guttata*). *FASEB Journal*, 10, 3681-3695.
- Kim, S., Wagner, H.N.Jr., Villemagne, V.L., Kao, P.F, Dannals, R.F., Ravert, H.T., ... Civelek, A.C. (1997). Longer occupancy of opioid receptors by nalmefene compared to naloxone as measured in vivo by a dual-detector system. *Journal of Nuclear Medicine*, 38,1726-31.
- Kim, H., Nelson, L. (2015). Reducing the ducing the harm of opioid overdose with the safe use of naloxone: a pharmacologic review. *Expert Opinion on Drug Safety*, 14 (7), 1137-1146.
- Knapp, P.E., Maderspach, K., Hauser, K.F. (1998). Endogenous opioid system in developing normal and jimpy oligodendrocytes: μ and κ opioid receptors mediate differential mitogenic and growth responses. *Glia*, 22, 189–201.
- Kolodziej, A., Stumm, R., Becker, A., Holtt, V. (2008). Endogenous opioids inhibit ischemia-induced generation of immature hippocampal neurons via the mu-opioid receptor. *European Journal of Neuroscience*, 27, 1311–1319.
- Kuhn, H.G., Dickinson-Anson, H., Gage, F.H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *Journal of Neuroscience*, 16, 2027–203.
- Kumar, A., Dudley, C., Moss, R. (1999). Functional dichotomy within the vomeronasal system: distinct zones of neuronal activity in the accessory olfactory bulb correlate with sex-specific behaviors. *The Journal for Neuroscience*, 19 (20), RC32.
- Lagrange, A.H., Ronnekleiv, O.K., and Kelly, M.J. (1997). Modulation of G protein-coupled receptors by an estrogen receptor that activates protein kinase A. *Molecular Pharmacology*, 51, 605–612.

- Lasagna, L. (1965). Drug interaction in the field of analgesic drugs. *Proceedings of the Natural Royal Society of Medicine*, 58 (11 part 2), 978-983.
- Lin, R., Iacovitti, L. (2015). Classic and novel stem cell niches in brain homeostasis and repair. *Brain Research*, 1628, 327–342.
- Lledo, P. M., Gheusi, G., Vincent, J.D. (2005). Information processing in the mammalian olfactory system. *Physiology Reviews*, 85, 281–317.
- Lledo, P.M. (2008). Adult Neurogenesis in the Olfactory Bulb in Adult Neurogenesis. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 425–443.
- Lois, C., Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, 5162, 1145-1148.
- Loyd, D., Murphy, A. (2014). The neuroanatomy of sexual dimorphism in opioid analgesia. *Experimental Neurology*, 259 (), 57–63.
- Liu, B., Du, L., Hong, J.S. (2000a). Naloxone protects rat dopaminergic neurons against inflammatory damage through inhibition of microglia activation and superoxide generation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 293 (2), 607-617.
- Liu, B., Du, L., Kong, L.Y., Hudson, P.M., Wilson, B.C., Chang, R.C., ... Hong, J.S. (2000b). Reduction by naloxone of lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in mouse cortical neuron-glia co-cultures. *Neuroscience*, 97 (4), 749-756.
- Liu, B., Jiang, J.W., Wilson; B.C., Du L., Yang, S.N., Wang, J.Y., Wu, G.C., ... Hong. J.S. (2000c). Systemic infusion of naloxone reduces degeneration of rat substantia nigral dopaminergic neurons induced by intranigral injection of lipopolysaccharide. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 295 (1), 125-132.

- Liu, S., Li, Y., Shi, G., Chen, Y., Huang, C., Hong, J., Wu, H.L. (2006). A novel inhibitory effect of naloxone on macrophage activation and atherosclerosis formation in mice. *Journal of the American College of Cardiology*, 48 (9), 871-879.
- Liu, Y., Qin, L., Wilson, B.C., An, L., Hong, J.S., Liu, B. (2002) Inhibition by naloxone stereoisomers of β -amyloid peptide (1-42)-induced superoxide production in microglia and degeneration of cortical and mesencephalic neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302 (3), 1212-1219.
- Lutz, P.E., Kieffer, B.L. (2013). Opioid receptors: distinct roles in mood disorders. *Trends in Neurosciences*, 36 (3), 195-206.
- Mak, G.K., Weis, S. (2007). Paternal recognition of adult offspring mediated by newly generated CNS neurons. *Nature*, 13 (6), 753-760.
- Mak, G.K., Enwere, E. K. (2011). Male pheromone-stimulated neurogenesis in the adult female brain: possible role in mating behavior. *Nature Neuroscience*, 10 (8), 1003-1011.
- Martin, L. (1976). Naloxone. *Annals of Internal Medicine*, 85, 765-768.
- Martinez, I., Paredes, R. G. (2001). Naloxone blocks place preference conditioning after paced mating in female rats. *Hormone Neuroscience*, 6 (115), 1363-1367.
- McCarthy, M., Pfaus, J. (1996). Steroid modulation of neurotransmitter function to alter female reproductive behavior. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 7 (9), 327-333.
- McClintock, M.K., Adler, N.T. (1978). The role of the female during copulation in wild and domestic Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Behaviour*, 67, 67-96.
- Ming, G. L., Song, H. (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system brain. *Annual Review of Neuroscience*, 28, 223–50.

- Ming, G.L., Song, H. (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*, 70, 687–702.
- Mohr, M.A. y Sisk, C.L. (2013). Pubertally born neurons and glia are functionally integrated into limbic and hypothalamic circuits of the male Syrian hamster. *Proceedures of the Natural Academy of Sciences*, 110 (12), 4792-4797.
- Moreno, M. (2009). Olfactory perceptual learning requires adult neurogenesis. *Proceedures of the Natural Academy of Sciences*, 106 (46), 17980-17985.
- Morris, P.L., Hopwood, M., Whelan, G., Gardiner, J., Drummond, E. (2001). Naltrexone for alcohol dependence: A randomized controlled trial. *Addiction*, 96, 1565–1573.
- Narita, M., Kuzumaki, N. (2006). Role of delta-opioid receptor function in neurogenesis and neuroprotection. *Journal of Neurochemistry*, 97 (5), 1494-1505.
- Ngai, S.H., Berkowitz, B.A., Yang, J.C. (1976). Pharmacokinetics of naloxone in rats and in man: basis for its potency and short duration of action. *Anesthesiology*, 44, 398-401.
- Niwa, A., Nishibori, M., Hamasaki, S., Kobori, T., Liu, K., Wake, H., Mori, S., Yoshino, T., Takashi, H. (2016). Voluntary exercise induces neurogenesis in the hypothalamus and ependymal lining of the third ventricle. *Brain Structure Function*, 221 (3), 1653-1666.
- Nottebohm, F. (1989). From bird song to neurogenesis. *Scientific American*. 260 (2), 74-79.
- Nottebohm, F. (2002). Neuronal replacement in adult brain. *Brain Research Bulletin*, 57 (6), 737-749.
- Nottebohm, F. (2004). The road we travelled: discovery, choreography, and significance of brain replaceable neurons. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1016, 628-658.

- Oboti, L., Peretto, P., De Marchis, S., Fasolo, A. (2011). From chemical neuroanatomy to functional understanding of the olfactory system. *European Journal of Histochemistry*, 55 (4), e35.
- Okamoto, M. (2012). Mild exercise increases dihydrotestosterone in hippocampus providing evidence for androgenic mediation of neurogenesis. *Proceedings of the Natural Academy in Sciences (USA)*, 109 (32), 13100–13105.
- Oliver, F., Ceccatelli, R., Schlumpf, M., Lichtensteiger, W. (2013). Developmental effects of perinatal exposure to PBDE and PCB on gene expression in sexually dimorphic rat brain regions and female sexual behavior. *General and Comparative Endocrinology*, 188, 232–241.
- Ostrowski, N.L., Pert, A. (1995). Substantia nigra opiate receptors on basal ganglia efferents. *Brain Research Bulletin*, 38, 513–523.
- Peirce, J.T., Nutall, R.L. (1961). Self-paced behavior in the female rat. *Journal of Comparative Physiological Psychology*, 54, 310–313.
- Pierce, E.F., Eastman, N., McGowan, R.W., Tripathi, H., Dewey, W.L., Olson, K., G. (1994). Resistance exercise decreases β -endorphin immunoreactivity. *British Journal of Sports Medicine*, 28, 164-166.
- Pfaus, J.G., Gorzalka, B.B. (1987). Opioids and sexual behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 11 (1), 1-34.
- Pfaus J.G., Smith, W., Coopersmith, C. (1999). Appetitive and consummatory sexual behaviors of female rats in bilevel chambers. *Hormones and Behavior*, 35, 224–240.
- Paredes, R.G., Vazquez, B. (1999). What do female rats like about sex? Paced mating. *Behavioral Brain Research*, 105, 117-127.
- Paredes, R.G., Martinez, I. (2001). Naloxone blocks place preference conditioning after paced mating in female rats. *Behavioral Neuroscience*, 115, 1363-1367.

- Persson, A.I., Thorlin, T., Bull, C., Zarnegar, P., Ekman, R., Terenius, L., Eriksson, P.S. (2003). Mu- and delta- opioid receptor antagonist decrease proliferation and increase neurogenesis in cultures of rat adult hippocampal progenitors. *European Journal of Neuroscience*, 17, 1159-1172.
- Pettit A.S., Des Roches R., Bennett S.A.L. (2012). The opiate analgesic buprenorphine decreases proliferation of adult hippocampal neuroblasts and increases survival of their progeny. *Neuroscience*, 20, 211–222.
- Peretto, P., Schellino, R., De Marchis, S., Fasolo, A. (2014). The interplay between reproductive social stimuli and adult olfactory bulb neurogenesis. *Neural Plasticity*, 2014: 497657.
- Portillo, W., Unda, N., Camacho, F.J., Sánchez, M., Corona, R., Arzate, D.M., ... Paredes, R.G. (2012). Sexual activity increases the number of newborn cells in the accessory olfactory bulb of male rats. *Frontiers in Neuroanatomy*. 6 (25).
- Reed, R. R. (1990). How does the nose know? *Cell*. 60, 1-2.
- Reynolds, B.A., Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 255, 1707-1710.
- Rocheffort, C., Gheusi, G., Vincent, J.D., Lledo, P.M. (2002). Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *The Journal of Neuroscience*, 22 (7), 2679–2689.
- Ruscio, M.G. (2008). Pup exposure elicits hippocampal cell proliferation in the prairie vole. *Behavioral Brain Research*, 187, 9–16.
- Sakellaridis, N., Vernadakis, A. (1986). An unconventional response of adenylate cyclase to morphine and naloxone in the chicken during early development. *Proceedings of Natural Academy Society (USA)*, 83, 2738-2742.
- Sargeant, T.J., Miller, J.H., Day, D.J. (2008). Opioidergic regulation of astroglial/neuronal proliferation/ where are we now? *Journal of Neurochemistry*. 107, 883–897.

- Scepkowski, L., Georgescu, M., Pfaus, J., (2006). Neuroendocrine factors in sexual desire and motivation en Goldestein, I. (editor) , Meston, C.M. (editor), Davis, S. R. (editor), Traish, A.M (editor), *Women's Sexual Function and Dysfunction: Study, diagnosis and treatment.* (pp. 159-163). Taylor and Francis: Spain.
- Shepherd, G.M., Chen, W.R. (2007). The olfactory granule cell: from classical enigma to central role in olfactory processing. *Brain Research Reviews*, 55 (2), 373-382.
- Sirinathsinghji, D.J.S., Whittington, P.E., Audsley, A., Fraser, H. M. (1983). β -Endorphin regulates lordosis in female rats by modulating LH-RH release. *Nature*, 301, 62-64.
- Struikmans, H., Rutgers, D.H., Jansen, G.H., Tulleken, C.A., van der Tweel, I., Batterman, J.J. (1997). S-phase fraction, 5-bromo-2'-deoxy-uridine labelling index, duration of S-phase, potential doubling time, and DNA index in benign and malignant brain tumors. *Radiation Oncology Investigations*, 5, 170–179.
- Taupin, P. (2007). BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: Paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Research Reviews*, 53, 198–214.
- Takahashi, J., Palmer, T.D., Gage, F.H. (1999). Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures. *Journal of Neurobiology*, 38 (1), 65–81.
- Tegeder, I., Geisslinger, G. (2004). Opioids as modulators of cell death and survival- Unraveling mechanisms and revealing new indications. *Pharmacological Reviews*. 56, 351-369.
- Thorpe, S., Thorpe, E. (2009). *General Studies Manual*. Pearson Education India. p. 17. ISBN 9788131721339.
- Tripathi, A., Khurshid, N., Kumar, P., Iyengar, S. (2008). Expression of delta- and mu-opioid receptors in the ventricular and subventricular zones of the developing human neocortex. *Neuroscience Research*, 61, 257–270.

- Van Ree, J.M., Niesink, R.J., Van Wolfswinkel, L., Ramsey, N.F., Kornet, M.M., Van Furth, W.R., Vanderschuren, L.J., Gerrits, M.A., Van den Berg, C.L. (2000). Endogenous opioids and reward. *European Journal of Pharmacology*, 405 (13), 89-101.
- Vargas-Barroso, V., Ordaz-Sánchez, B., Peña-Ortega, F., Larriva-Sahd, J. (2016) Electrophysiological evidence for a direct link between the main and accessory olfactory bulbs in the adult rat. *Frontiers in Neuroscience*. 9 (518),1- 14.
- van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F.H. (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature Neuroscience*, 2 (3), 266–270.
- van Praag, H., Schinder, A.F., Christie, B.R., Toni, N., Palmer, T.D., Gage, F.H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 415, 1030–1034.
- Vivar, C., Potter, M., van Praag, H., (2013). All about running: synaptic plasticity, growth factors and adult hippocampal neurogenesis. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 15, 189–210.
- Wang, Q., Zhou, H., Gao, H., Chen, S.H., Chu, C.H., Wilson, B., Hong, J.S. (2012). Naloxone inhibits immune cell function by suppressing superoxide production through a direct interaction with gp91^{phox} subunit of NADPH oxidase. *Journal of neuroinflammation*, 9 (32).
- Wang, T., Su, N., Shih, P., Tsai, P., Huang, C. (2014). Anti-inflammation effects of naloxone involve phosphoinositide 3-kinase delta and gamma. *Journal of surgical research*, 192 (2), 599-606.
- Watkins, L.R., Hutchinson, M.R., Rice, K.C., Maier, S.F. (2009). The “toll” of opioid-induced glial activation: improving the clinical efficacy of opioids by targeting glia. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30, 581-591.

- Wilner, D., Cohe-Yeshurun, A., Avida, A., Ozersky, V., Shohami, E., Leker, R. (2014). Short term morphine exposure in vitro alters proliferation and differentiation of neural progenitor cells and promotes apoptosis via mu receptors. *PLoS One*, 9(7): e103043.
- Whistler, J.L., Chuang, H.H., Chu, P., Jan, L.Y., von Zastrow, M. (1999). Functional dissociation of mu opioid receptor signaling and endocytosis: Implications for the biology of opiate tolerance and addiction. *Neuron*, 23, 737–746.
- Yassen, A., Olofsen, E., van Dorp, E. (2007). Mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of the reversal of buprenorphine-induced respiratory depression by naloxone: a study in healthy volunteers. *Clinical Pharmacokinetics*, 46 (11), 965-980.
- Zagon, I.S., Gibo, D.M., McLaughlin, P.J. (1991). Zeta (zeta) a growth-related opioid receptor in developing rat cerebellum: identification and characterization. *Brain Research*, 551 (1-2), 28–35.
- Zagon, I.S., Gibo, D.M., McLaughlin, P.J. (1992). Ontogeny of zeta (zeta), the opioid growth factor receptor, in the rat brain. *Brain Research*, 596 (1-2), 149–156.
- Zou, D.J., Chesler, A., Firestein, S. (2009). How the olfactory bulb got its glomeruli: a just so story? *Nature Reviews Neuroscience*, 10, 611-618.

8. Lista de figuras

Figura 1. Cadena de eventos desde la activación del receptor a un odorante hasta la apertura de canales iónicos. Tras la unión de la molécula odorante con su receptor en la membrana plasmática de los cilios de la neurona sensorial olfatoria, inicia una cascada de transducción dependiente de proteínas G (disociación de la subunidad α) y GTP (guanosín trifosfato) que activa la enzima adenilato ciclasa (AC), quien produce el segundo mensajero AMPc (adenosín monofosfato cíclico). Posteriormente, AMPc se une a canales iónicos asociados a nucleótidos cíclicos (ANC), los cuales tras su apertura incrementan el flujo de cationes a la célula (Na^+ y Ca^+) y también se favorecen la salida de aniones por canales iónicos de cloro (Cl^-) despolarizando así la membrana de la neurona sensorial olfativa. (Figura modificada de Zou et al., 2009).

Figura 2. Esquema de las distintas capas del bulbo olfatorio. En primer lugar se encuentra el epitelio olfatorio (EO) en donde se encuentran los somas de las células receptoras olfativas (CRO). Después en la capa glomerular (GL), se localizan interneuronas locales (PG) y glómerulos (GI) formados por sinapsis dendrodendríticas de las células sensoriales con las dendritas de las células mitrales (Mit), cuyos somas se encuentran entre la capa plexiforme externa (PE) y la capa plexiforme interna (PI), en donde se localizan los somas de las células granulares (Gr), que contactan dendritas laterales de las células mitrales (Modificado de Lledo et al., 2005).

Figura 3. Sistema olfatorio de un roedor. Vista sagital simplificada del cráneo de la rata, el sistema olfatorio principal está representado en verde y comprende el epitelio olfatorio principal (EO) y bulbo olfatorio principal (BOP) con sus principales proyecciones nervio olfatorio accesorio (NOA), corteza peririnal (CP), tubérculo olfatorio (TO), amígdala lateral (AL) y corteza entorrinal (CE). El sistema olfatorio accesorio se muestra en rojo integrado por el órgano vomeronasal (VNO) y bulbo olfatorio accesorio (BOA), con sus principales proyecciones amígdala ventral (AV) e hipotálamo (H) (Modificada de Lledo et al., 2005).

Figura 4. Etapas de la NG en el BO y su modulación: 1) Proliferación en la ZSV, expresión de factores intrínsecos (1A) como programas neurogénicos (PAX6/WNT) o gliogénicos (OLIG2/Notch), así como factores externos que la modulan (1B) como neurotransmisores; serotonina (5-HT), dopamina (DA), acetilcolina (ACh) y óxido nítrico (NO), hormonas (tiroidea, prolactina, pregnenolona, y factores de crecimiento (FC) como EGF (FC epidérmico), HB-EGF (FC epidérmico de unión a heparina), VEGF (FC endotelial vascular), FGF (FC de fibroblastos), CNTF (FC ciliar), TFG α (FC transformante alfa) y BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro). 2A) Migración tangencial y factores externos del microambiente de la vía migratoria rostral (RMS) así como migración radial y factores externos de atracción o repulsión de los neuroblastos (2B). C) Incorporación a las diversas capas y diferenciación a dos subtipos de interneuronas; granulares y periglomerulares y finalmente factores externos que modulan la supervivencia como neurotransmisores ACh (acetilcolina) y manipulaciones experimentales (actividad sensorial, enriquecimiento de olores, exposición a olores). Finalmente en la parte inferior se muestra la progresión de los tipos celulares a lo largo de la NG desde las células madre hasta neuroblastos (Modificado de Lledo et al., 2006).

Figura 5. Distribución anatómica de los receptores a opioides según su densidad de expresión; alta o baja para receptores μ (color rojo), receptores δ (color amarillo) y receptores κ (color azul) expresados en diversos circuitos del cerebro de un roedor; bulbo olfatorio, corteza prefrontal, núcleo accumbens, hipocampo, habénula, tálamo, núcleo basal de la estría terminal (nbst), hipotálamo, amígdala, área tegmental ventral (ATV), locus coeruleus (LC) (Modificado de Lutz et al., 2013).

Figura 6. Estructura molecular de la (5^a)-4,5-Epoxi-3,14-dihidroxi-17-(2-propenil) morfina-6-ona; NX (Kim et al., 2015).

Figura 7. Cronograma experimental: Administración de hormonas, fármaco NX o salina, administración de BrdU, prueba de conducta y sacrificio.

Figura 8. Fotos representativas de los grupos experimentales. Control salina o control NX (azul), cópula no regulada (rojo) y CR o CR con NX (verde).

Figura 9. Foto representativa del BOA con sus diferentes capas Gl (glomerular) Mi (mitral) y Gr (granular) de una hembra que fue tratada con BrdU durante la gestación (control positivo) y en cuyo tejido se realizó IH para detectar BrdU. Se observan las células inmunorreactivas como pequeños puntos de color negro (ejemplo señalado con una flecha).

Figura 10. Reconstrucción de un corte sagital del BO, presentando los AOI (círculos) por capa del BOP y BOA en sus capas granular (Gra), glomerular (Glo) y mitral (Mi), en donde se cuantificaron las células IR BrdU.

Figura 11. Foto representativa del triple marcaje en donde se observan astrocitos (verde), neuronas (rojo), y células marcadas con BrdU (azul). Dentro del recuadro superior se observa un doble marcaje de neurona con BrdU y en el cuadro inferior un doble marcaje de astrocito con BrdU.

Figura 12. Fotografía tomada con el objetivo 20x y con un total de 6x7 cuadros en donde se puede apreciar una reconstrucción de un corte sagital de un BOA tratado con IF para NeuN (rojo), GFAP (verde) y BrdU (azul).

Figura 13. Adquisición de las imágenes por medio de microscopía confocal. A) Canal verde, células IR GFAP. B) Canal rojo, células IR NeuN. C) Canal azul, células IR BrdU. D) Tres canales activos y un acercamiento a un AOI. E) Corte ortogonal para confirmar colocalización. F) Procesamiento en 3D para verificar doble marcaje.

Figura 14. Número de células inmunorreactivas por mm^2 en la capa glomerular, mitral y granular del BOP. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba realizada (ANDEVA).

Figura 15. Número de células IR por mm^2 en la capa glomerular (A), mitral (B) y granular (C) del BOA en sus partes anterior y posterior. * $p < .01$ respecto a los demás grupos (Post hoc Fischer).

Figura 16. Número de células IR BrdU en la capa granular anterior del BOA (color azul), así como los dobles marcajes NeuN+BrdU (representados con número y color rojo) y GFAP+BrdU (color verde). Los datos se representan como la media y el error estándar, * $p < 0.05$ respecto al grupo de CR NX (Kruskal-Wallis).

Figura 17. Porcentajes de células IR NeuN respecto a otros marcajes en los tres grupos (Control salina, CR tratadas con salina y CR tratadas con NX)

Figura 18. Porcentaje entre el número de células IR NeuN + BrdU y células IR GFAP + BrdU.

10. Lista de tablas

Tabla 1. Agunos blancos moleculares de acción de NX, mecanismos de acción y efectos.

Tabla 2. Parámetros de conducta sexual de los tres grupos: CR por la hembra tratada con salina, CR por la hembra tratada con NX y cópula no regulada. III (intervalo inter-intromisión), CL (coeficiente de lordosis), IML (intensidad media de lordosis), LRM (latencia de regreso después de la monta), LRI (latencia de regreso después de la intromisión), %SDM (porcentaje de salida después de la monta), %SDI (porcentaje de salida después de la intromisión). Los datos se expresan como media y el error estándar. * $p < 0.05$ de los grupos de cópula regulada respecto al grupo de cópula no regulada.