



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

INCORPORACIÓN Y FUNCIÓN DE NEURONAS NUEVAS EN EL BULBO
OLFATORIO DESPUÉS DE LA CÓPULA REGULADA POR LA RATA HEMBRA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

REYNALDO ABRAHAM ALVARADO MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. RAÚL GERARDO PAREDES GUERRO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA, UNAM

COMITÉ TUTOR

DRA. MARÍA MAGDALENA GIORDANO NOYOLA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

DR. JOSÉ ALONSO FERNÁNDEZ GUAISTI
DEPT. FARMACOBIOLOGÍA, CINVESTAV SEDE SUR

QUERÉTARO, QRO, Mayo del 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**INCORPORACIÓN Y FUNCIÓN DE NEURONAS
NUEVAS EN EL BULBO OLFATORIO DESPUÉS
DE LA CÓPULA REGULADA POR LA RATA
HEMBRA**

TESIS

Que para obtener el título de
Doctor en Ciencias

P R E S E N T A

M. en C. Reynaldo Abraham Alvarado Martínez

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Raúl Gerardo Paredes Guerrero



Querétaro, Qro. 2018

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por su apoyo financiero para el desarrollo y conclusión del programa de Doctorado 245202.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Neurobiología de la UNAM, campus Juriquilla.

Al Dr. Raúl Paredes por su confianza total al permitirme desarrollar un proyecto bajo su supervisión, a la Dra. Wendy Portillo por su incondicionable ayuda en todo momento.

A la Dra. Magdalena Giordano por sus siempre acertadas críticas, así como al Dr. Alonso Fernández, por sus aportaciones invaluable a lo largo del doctorado.

A todos los miembros del laboratorio D-11, en especial a Enrique Min, Melani Velazco, Tania Aguilar por su apoyo técnico y a Marianela Santoyo por ser un pilar fundamental en el desarrollo técnico del proyecto, a Rebeca Cortés por todo el apoyo burocrático realizado.

Mi más profundo agradecimiento por todo el apoyo técnico de Nydia Hernández responsable de la unidad de microscopía, a Lourdes Lara responsable de la unidad de videoconferencia y a Ramón Martínez responsable de la unidad de computó.

A la M. en C. Leonor Casanova por su inagotable paciencia en la asistencia de cada tramite correspondiente al inicio y fin de semestre, a lo largo de los ya más de 7 años.

DEDICATORIAS

A mi esposa Alejandra Cruz, por su confianza, comprensión y paciencia en la culminación de este proyecto personal.

A mi hijo Leonardo Alvarado por ser la más grande motivación para seguir adelante.

A mis padres Reynaldo Alvarado y Angélica Martínez, por ser siempre una inspiración de que con esfuerzo podemos lograr lo que nos proponemos.

A mis hermanos Abigail, Juan Pablo y Luis Ángel, por ser siempre mis confidentes y amigos más cercanos.

1 ÍNDICE GENERAL

1. Índice
2. Resumen
3. Abstract
4. Lista de Figuras
5. Lista de Tablas
6. Lista de Abreviatura
7. INTRODUCCIÓN
8. ANTECEDENTES
 - 8.1. La neurogénesis
 - 8.1.1. Los nichos neurogénicos en el cerebro el adulto
 - 8.1.2. La zona subventricular y el sistema olfatorio
 - 8.2. El sistema olfatorio principal
 - 8.2.1. El bulbo olfatorio principal
 - 8.2.2. Los núcleos olfatorios del sistema olfatorio principal
 - 8.3. Sistema olfatorio accesorio
 - 8.3.1. El bulbo olfatorio accesorio
 - 8.3.2. Los núcleos olfatorios del sistema olfatorio accesorio
 - 8.4. La conducta sexual de la rata
 - 8.4.1. El ciclo estral y su control endócrino
 - 8.4.2. El control neuronal de la conducta sexual
 - 8.4.3. Adaptaciones fisiológicas inducidas por la experiencia sexual
 - 8.4.3.1. La cópula regulada (CR) y la neurogénesis
9. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA
10. HIPÓTESIS
11. OBJETIVO DEL PROYECTO
 - 11.1. Objetivos particulares
12. MÉTODOS
 - 12.1. Sujetos experimentales
 - 12.2. Administración de 5-bromo-2'deoxiuridina (BrdU)
 - 12.3. Protocolo conductual de la cópula regulada y la no regulada

- 12.4. Sacrificio de los animales experimentales y la obtención del tejido biológico
- 12.5. Inmunohistoquímica contra BrdU
 - 12.5.1. Cuantificación de las células inmunorreactivas a BrdU
- 12.6. Inmunofluorescencia contra BrdU, NeuN y c-fos
 - 12.6.1. Cuantificación celular y el análisis de colocalización
- 13. ANALISIS ESTADÍSTICO
- 14. RESULTADOS
 - 14.1. Despliegue de la conducta sexual en el grupo de cópula regulada 5 sesiones
discusión
 - 14.2. Parámetros de la conducta sexual del grupo de cópula regulada 10 sesiones
 - 14.3. Parámetros de la conducta sexual del grupo de cópula No regulada 10 sesiones
 - 14.4. Comparación estadística entre los tres grupos de cópula
 - 14.5. La cuantificación de las células inmunorreactivas a brdU
 - 14.5.1. La cuantificación de células inmunorreactivas a brdU en el bulbo olfatorio principal
 - 14.5.2. La cuantificación de células inmunorreactivas a brdU en el bulbo olfatorio accesorio
 - 14.6. La cuantificación de células brdu/neun positivas
- 15. DISCUSIÓN
- 16. CONCLUSIÓN
- 17. BIBLIOGRAFÍA

2. RESUMEN

La neurogénesis es el surgimiento de nuevas neuronas dentro del sistema nervioso central, en el adulto existen regiones o nichos en el cerebro que conservan la capacidad de integrar nuevos elementos celulares de manera constante. Uno de ellos es la zona subventricular (ZSV), cuyas células nuevas emigran hacia el bulbo olfatorio (BO) de manera constante. Diversos paradigmas experimentales pueden incrementar el número de células producidas en la ZSV, como lo es, la experiencia sexual. En nuestro laboratorio demostramos que cuando la hembra regula la frecuencia y la cantidad de eventos copulatorios en su primera experiencia sexual (cópula regulada, CR1s), se incrementa el número de células nuevas en la ZSV, células que podemos localizar en el BO principal y accesorio 16 días después. Siendo este efecto presentando un mayor número de células cuando la hembra realiza 4 sesiones de cópula regulada (CR4s). El incremento de células era significativamente mayor con respecto al grupo que realizó una sola cópula regulada. Al evaluar si este incremento celular se mantenía durante 45 días, tiempo de incorporación celular en el BO, se encontró que los niveles celulares habían disminuido, probablemente por la ausencia de estimulación sensorial. Se ha reportado que la activación sensorial constante es un promotor importante en la supervivencia celular en el circuito del BO. Por esta razón en el presente trabajo se incrementó el número de sesiones de cópula regulada a 10 (CR10s), abarcando el periodo crítico de incorporación de las nuevas células, con los objetivos de: 1) Evaluar si existe un cambio conductual en el grupo de CR10s; y 2) Si la CR10s promueve mayor supervivencia celular que en un grupo de CR5s a los 45 días. Para ello utilizamos ratas hembra wistar (220gr), ovariectomizadas e inyectadas el primer día de prueba con 5-bromo-2'-deoxyuridina (BrdU, 300 mg/kg, un marcador mitótico). Se registró la conducta sexual durante 1 hora en las 10 sesiones de cópula y en la última sesión se sacrificó a la rata, procediendo al análisis histológico para la detección de células nuevas. Nuestros resultados indicaron cambios significativos en el grupo de CR10s, en dos capas celulares: En la capa glomerular del BOA, presentó un incremento en el número de células, pero no así en la diferenciación a neuronas. Mientras que en la capa granular de BOP, no encontramos diferencias significativas en el número de células pero sí un incremento en las células diferenciadas hacia neuronas. Estos resultados nos hablan de un efecto diferencial producido por la cópula regulada en estructuras relacionadas con el procesamiento olfatorio.

3. ABSTRACT

The adult brain retain the ability to integrate new cellular elements constantly. One of them is the subventricular zone (SVZ), whose new cells migrate to the olfactory bulb (OB) steadily. Different experimental paradigms can increase the number of cells produced in the SVZ, as it is, the sexual experience. In our laboratory we show that when the female regulates the frequency and number of copulatory events in her first sexual experience (paced mating, PM1s), the number of new cells in the SVZ increases, cells that can be located in the OB 16 days later. Being this effect presenting a greater number of cells when the female performs 4 sessions of paced mating (PM4s). The increase in cells was significantly greater than the group that performed a single session. When evaluating if this cellular increase was maintained during 45 days, time of cellular incorporation in the OB, it was found that the cellular levels had decreased, probably due to the absence of sensorial stimulation. Constant sensory activation has been reported to be an important promoter in cell survival in the OB circuit. For this reason, in the present study, the number sexual sessions was increased (PM10s), covering the critical period of incorporation of the new cells, with the objectives of: 1) Evaluating if there is a behavioral change in the group of PM10s; and 2) If PM10s promotes greater cell survival than in a group of PM5s at 45 days. We used female wistar rats (220gr), ovariectomized and injected on the first day of the test with 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, 300 mg/kg, a mitotic marker). The sexual behavior was recorded for 1 hour in the 10 sessions and the last session all groups were sacrificed, proceeding to the histological analysis for the detection of new cells. Our results indicated significant changes in the group of PM10s, in two cell layers: In the glomerular layer of accessory olfactory bulb, presented an increase in the number of cells, but not in the differentiation to neurons. While in the granular layer of main olfactory bulb, we found no significant differences in cell numbers but rather an increase in differentiated cells towards neurons. These results tell us about a differential effect produced by paced mating in structures related to olfactory processing through time.

4. LÍSTA DE FIGURAS

- Figura 1.- Ubicación de los nichos neurogénicos en el cerebro de una rata adulta.
- Figura 2.- Representación del sistema olfatorio principal en el roedor y sus núcleos olfativos superiores.
- Figura 3.- Representación de la anatomía y distribución del sistema olfatorio accesorio en el roedor y sus núcleos olfativos superiores.
- Figura 4.- Representación de los cambios posturales de la rata hembra durante la lordosis.
- Figura 5.- Control endocrino del estradiol y la progesterona durante el ciclo estral de la rata hembra.
- Figura 6.- Localización del núcleo ventromedial del hipotálamo en el cerebro de la rata hembra.
- Figura 7.- Diagrama de los grupos experimentales con sus respectivas sesiones de conducta.
- Figura 8.- Representación esquemática del protocolo de administración de BrdU.
- Figura 9.- Grado de dorsiflexión de la rata hembra ante un evento copulatorio del macho.
- Figura 10.- Imagen representativa de un corte de bulbo olfativo de rata.
- Figura 11. Reconstrucción fotográfica del bulbo olfatorio obtenida mediante microscopía confocal.
- Figura 12.- Número de células BrdU positivas por mm^2 en las 3 capas del BOP, glomerular, mitral y granular.
- Figura 13.- El análisis cuantitativo de las células inmunorreactivas a BrdU en el bulbo olfatorio accesorio (BOA).
- Figura 14.- Inmunofluorescencia para BrdU y NeuN en el bulbo olfatorio principal y accesorio.
- Figura 15.- Vista ortogonal de una célula doblemente marcada para BrdU/NeuN.

5. LISTA DE TABLAS

Tabla 1.- Anticuerpos usados para la detección de los antígenos de BrdU, NeuN y c-fos.

Tabla 2.- Resultados conductuales del grupo de cópula regulada 5 sesiones (CR5s).

Tabla 3.- Resultados conductuales del grupo de cópula regulada 10 sesiones (CR10S).

Tabla 4.- Resultados conductuales del grupo de cópula NO regulada 10 sesiones (CNR10S).

Tabla 5.- Comparación conductual entre los tres grupos de cópula.

Tabla 6.-Porcentaje de células doblemente marcadas para BrdU/NeuN por capas anatómicas en el BOA y BOP, en cópula regulada y no regulada durante 10 sesiones.

6. LISTA DE ABREVIATURAS

%SDE	Porcentaje de salidas después de una eyaculación
%SDI	Porcentaje de salidas después de una intromisión
%SDM	Porcentaje de salidas después de una monta
ACN	Núcleo cortical anterior
AOIs	Áreas ópticas de interés
AON	Núcleo olfatorio anterior
BDNF	Factor neurotrófico del cerebro
BE	Benzoato de estradiol
BNST _p	Cama del núcleo de la estría terminalis
BO	Bulbo olfatorio
BOA	Bulbo olfatorio accesorio
BOP	Bulbo olfatorio principal
BrdU	5-bromo-2'desoxiuridina
cAMP	Adenosín-monofosfato-cíclico
Células E	Células Ependimales
CL	Coefficiente de lordosis
CNR	Cópula No regulada
CNR10s	Cópula No regulada 10 sesiones
CR	Cópula regulada
CR-1s	Cópula regulada una sesión
CR-4s	Cópula regulada cuatro sesiones
CR10s	Cópula regulada 10 sesiones
CR5s	Cópula regulada 5 sesiones
EC	Corteza entorrinal
ECs	Células endoteliales
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EO	Epitelio olfatorio
EV	Epitelio vomeronasal
FGF-2	Factor-2 de crecimiento de fibroblasto
FSH	Hormona folículo estimulante
GFAP	Proteína ácido glúal fibrilar
GL	Capa glomerular
GnRH	Hormona liberadora de las gonadotropinas
Gr	Capa granular
i.p.	Intra peritoneal
III	Intervalo inter intromisión
IML	Intensidad media de lordosis
LH	Hormona luteinizante
LRE	Latencia de regreso después de la eyaculación
LRI	Latencia de regreso después de la intromisión

LRM	Latencia de regreso después de la monta
M	Capa mitral
MCs	Células mitrales
MeA	Amígdala medial
MPOA	Área preóptica medial del hipotálamo
NAcc	Núcleo acumbens
NSCs	Células troncales neuronales
nSo	Neuronas sensoriales olfatorias
OT	Tubérculo olfatorio
OV	Órgano vomeronasal
OVX	Ovariectomía
P4	Progesterona
PAG	Sustancia gris periacueductal
PIR	Corteza piriforme
PLC	Preferencia de lugar condicionado
PLCN	Núcleo cortical posterolateral amigdaloides
PMCN	Parte cortical posteromedial de la amígdala
RMS	Corriente migratoria rostral
TT	Tenia tecta
VCS	Estimulación vagino cervical
VMH	Hipotálamo ventromedial
VRNs	Neuronas sensoriales vomeronasales
ZSG	Zona subgranular
ZSV	Zona subventricular

7. INTRODUCCIÓN

La neurogénesis es un proceso conservado en la etapa adulta, en sitios específicos llamados nichos neurogénicos. Uno ubicado en el giro dentado en el hipocampo en una región denominada zona subgranular (ZSG), el otro se localiza en la porción inferior de los ventrículos laterales llamada zona subventricular (ZSV), lugar desde donde las células que nacen, migran hacia el bulbo olfatorio (BO) (Li and Xie, 2005; Lois et al., 1996).

El bulbo olfatorio es un elemento del sistema olfatorio, responsable de detectar, procesar y transmitir información química presente en el ambiente, adquiriendo en la rata una segunda función, el de reconocimiento y la discriminación de las características de otros congéneres (Berghard et al., 1996). El sistema olfatorio juega un papel esencial en el correcto despliegue de la conducta sexual en la rata.

La conducta sexual en la rata comprende una serie de patrones motores complejos que facilitan la transferencia exitosa del esperma del macho hacia el tracto reproductivo de la hembra. De esta manera la experiencia sexual en la hembra, determinada como la cantidad de interacciones sexuales recibidas por parte del macho, como lo son el número de montas, de intromisiones y de eyaculaciones, influyen en el grado de estimulación vagino cervical (VCS) (Meerts et al., 2014). Estudios realizados en ambientes naturales o semi-naturales han demostrado que la hembra tiene un papel muy activo en la interacción sexual regulando los contactos copulatorios (Erskine and Baum, 1982; McClintock and Adler, 1978) . Esta capacidad, conocida como cópula regulada por la hembra (CR), en donde es la rata hembra quien determina la frecuencia y contactos copulatorios que recibe del macho, se observa en condiciones de laboratorio al utilizar un caja dividida por una barrera en donde únicamente la hembra de menor tamaño puede atravesar. Se ha reportado que la cópula regulada induce una serie de adaptaciones fisiológicas, entre las que destacan mayor éxito reproductivo (Erskine and Baum, 1982), generación de estados afectivos positivos (Paredes and Alonso, 1997), así como un incremento en la liberación de la hormona luteinizante, oxitocina y prolactina relacionadas con la ovulación y preñez (Blake and Sawyer, 1972; Terkel and Sawyer, 1978), así como cambios plásticos y neurogénesis en el BO (Arzate et al., 2013; Corona et al., 2011).

En nuestro laboratorio hemos estudiado la conducta sexual, tanto en condiciones de cópula regulada por la hembra “pacing” (CR), como en condiciones de cópula no regulada por la hembra “no-pacing” (CNR). En esta última condición la animales copulan sin la división de

acrílico que separa el compartimento del macho (Arzate et al., 2013; Corona et al., 2011). Ambos paradigmas copulatorios promueven respuestas conductuales distintas en la hembra y en el macho, como lo son en el número de montas, de eyaculaciones y en la frecuencia con que reciben intromisiones por parte del macho. Cuando la hembra regula los contactos copulatorios, recibe menos montas, menos eyaculaciones y una frecuencia menor de intromisión por serie eyaculatoria, mientras que en la CNR ocurre lo contrario (Corona et al., 2011; Paredes and Vazquez, 1999)

Así mismo la CR promueve en la rata hembra un estado afectivo positivo (estado hedónico) (Paredes, 2009), aspecto que no ocurre en la cópula no regulada, evaluado mediante la tarea de preferencia de lugar condicionado (PLC) (Arzate et al., 2013).

Otra característica importante de la cópula regulada es que aumenta de manera significativa la cantidad de células en el bulbo olfatorio principal y accesorio (Corona et al., 2011), asociado al número de sesiones copulatorias. Es decir, las ratas hembra que fueron expuestas a cuatro sesiones de cópula regulada (CR-4S), tuvieron un mayor número de células inmunorreactivas para BrdU (marcador de división celular), en comparación con aquellas hembras que solo realizaron una sesión de cópula (CR-1S) (Arzate et al., 2013). Sin embargo, este incremento celular asociado al número de sesiones de cópula no se mantuvo a los 45 días momento en que se considera como la etapa de integración y supervivencia celular en el BO (Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002). Sugiriendo de esta manera que el incremento celular asociado a las cuatro sesiones de cópula, no son suficientes para el mantenimiento de las nuevas células al cabo de 45 días.

Es por esta razón que en el presente trabajo nos propusimos extender el número de sesiones de cópula a 10 sesiones (CR10S), abarcando los 45 días descritos para la supervivencia e incorporación celular (Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002), ya que se tiene evidencia de que es necesaria la constante activación sensorial de las nuevas células recién integradas al circuito del bulbo olfatorio para su supervivencia (mayor a 45 días) aspecto que no ocurre si únicamente se evalúan 4 sesiones de cópula abarcando únicamente 16 días

8. ANTECEDENTES

8.1. LA NEUROGÉNESIS

El término neurogénesis se entiende como el surgimiento de nuevas neuronas dentro del sistema nervioso. En mamíferos la neurogénesis está asociada principalmente al desarrollo embrionario, momento en el cual se establecen la mayoría de los circuitos neuronales (Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002). A partir de los trabajos realizados por Santiago Ramón y Cajal a principios del siglo XX, acerca de la anatomía del sistema nervioso y sus elementos celulares, nació la idea de que no existe un remplazo de las células del sistema nervioso en el adulto, a diferencia de lo que ocurre en otros tejidos como el sistema tegumentario, el sistema hematopoyético, entre otros que mantienen un constante recambio celular indispensable para la homeostasis del organismo (Li and Xie, 2005; Weissman et al., 2001). No fue hasta la década de los 60 cuando Altman y Das (Altman and Das, 1965), utilizando la timidina tritiada ($[^3\text{H}]$ timidina), demostraron por primera vez la existencia de precursores celulares en el cerebro adulto de la rata. El uso de la $[^3\text{H}]$ timidina sentó las bases para el estudio del origen de nuevas neuronas en el cerebro, posteriormente surgieron nuevas técnicas con notables ventajas en el método de revelado, como el uso de otros análogos de la timidina como la Bromo-2'-deoxyuridina (BrdU), cuya detección es mediante el uso de anticuerpos específicos para BrdU, cuyo marcaje se puede asociar además a linajes celulares particulares como de origen glial (proteína ácido glial fibrilar, GFAP) o neuronal (NeuN) (Magavi and Macklis, 2002; Miller and Nowakowski, 1988).

En medio del escepticismo y la resistencia de la comunidad científica, este primer trabajo marcó una notable línea de investigación durante los siguientes 20 años, encontrando cada vez mayor apoyo en trabajos que confirmaban la existencia de dicho proceso en varias especies (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002; Miller and Nowakowski, 1988), incluyendo el humano (Eriksson et al., 1998; Reynolds and Weiss, 1992). De esta manera surgió un nuevo concepto en la fisiología del sistema nervioso, “neurogénesis en el adulto”, el cual comprende funciones y regiones neuronales específicas. A diferencia de la neurogénesis embrionaria que es un proceso generalizado a lo largo y ancho del encéfalo, en el adulto, la neurogénesis se lleva a cabo en dos sitios específicos en el cerebro. El primer sitio se ubica en el giro dentado en el hipocampo, en una región denominada zona subgranular (ZSG) (Li and Xie, 2005). El segundo sitio, se encuentra en la porción inferior de los ventrículos laterales,

llamada zona subventricular (ZSV) (Fig. 1A), desde donde las células migran hacia el bulbo olfatorio (BO) (Li and Xie, 2005; Lois et al., 1996). Es interesante que ocurra neurogénesis en estructuras que cumplen papeles aparentemente distintos, ya que el hipocampo, es una estructura que forma parte del sistema límbico y está relacionada con la memoria y el aprendizaje, mientras que el BO es el primer relevo en el procesamiento de la información olfativa (Miller and Nowakowski, 1988).

8.1.1. LOS NICHOS NEUROGÉNICOS EN EL CEREBRO ADULTO

El cerebro de los mamíferos es un órgano complejo que está compuesto por cerca de un trillón de neuronas, en su mayoría originadas desde los estadios embrionarios, esto le confiere al sistema una relativa estabilidad celular, mucho más notable en regiones con un alto grado de procesamiento de información. Sin embargo, existen regiones específicas que aún conservan la capacidad de integrar nuevos elementos celulares a partir de células troncales neuronales (NSCs, por sus siglas en inglés) (Doetsch et al., 1997; Doetsch et al., 2002). A estos sitios se les ha acuñado el término de nichos neurogénicos, debido a que poseen un microambiente altamente especializado, que permite su proliferación, diferenciación y supervivencia (Doetsch et al., 1997; Doetsch et al., 2002). Ambos nichos neurogénicos ZSG y ZSV (Fig. 1A), comparten elementos celulares, como los son: los astrocitos, células ependimales (células E), células endoteliales (ECs), las células troncales neuronales (NSCs) y por su puesto neuronas maduras (Alvarez-Buylla and Lois, 1995; Doetsch et al., 1997).

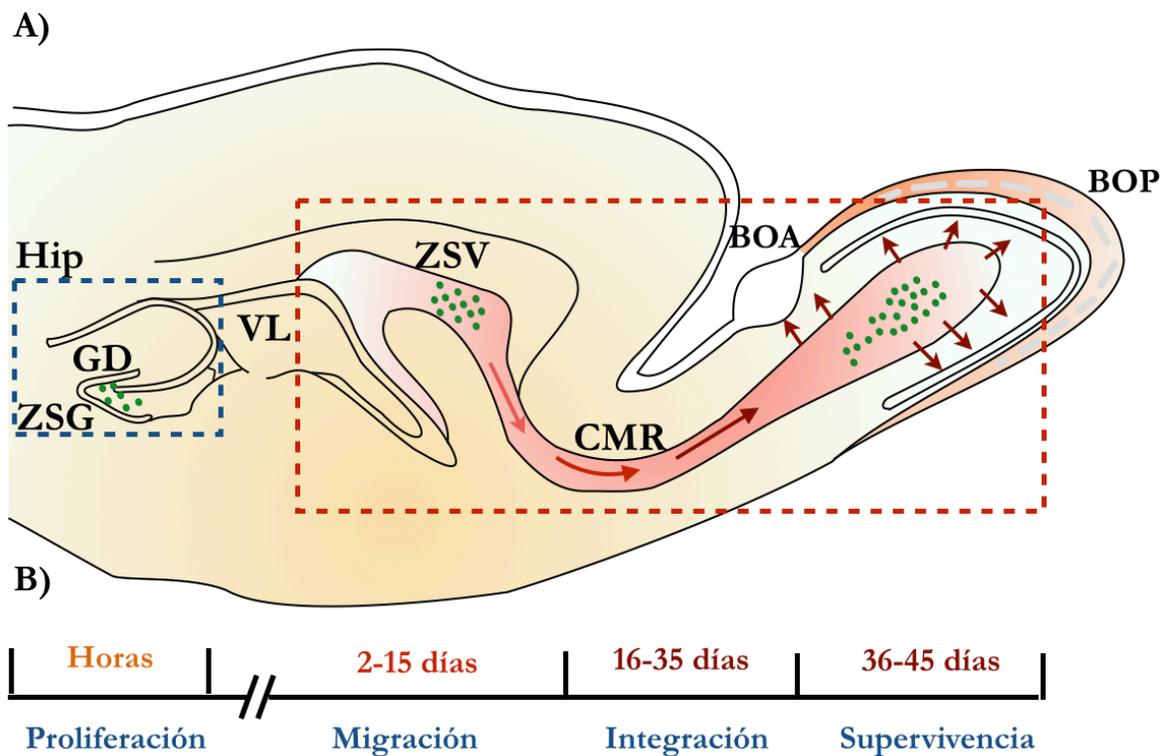


Figura 1.- Ubicación de los nichos neurogénicos en el cerebro de una rata adulta. A) Se muestran los dos sitios neurogénicos, el hipocampo (Hip) y la zona subventricular (ZSV), así mismo se señala la dirección la migración de las células originadas hacia el bulbo olfativo principal (BOP) y accesorio (BOA). B) Etapas el desarrollo celular de la ZSV abarcando desde la proliferación (Horas), la migración (2-15 días), hasta su integración a circuitos neuronales pre-existentes en el BO (16-35 días) y supervivencia (36-45). (Modificado de Lledo et al., 2006).

8.1.2. LA ZONA SUBVENTRICULAR Y EL SISTEMA OLFATORIO

En el roedor adulto la SVZ está compuesta principalmente por cuatro tipos celulares (A, B, C y células endodiales) (Doetsch et al., 1997). Las células migradoras o células tipo A, son células con un soma alargado o fusiforme que posee un proceso apical largo en un extremo y otro generalmente corto en el polo opuesto. Son estrictamente neuroblastos en formación y se ubican a lo largo y ancho de la pared de la SVZ, éstas células migran a modo de cadenas hacia la parte anterior de la SVZ en dirección a la corriente migratoria rostral (RMS, por sus siglas en inglés) para arribar al BO (Lois et al., 1996). En su migración hacia el bulbo olfatorio los neuroblastos comienzan a diferenciarse principalmente en interneuronas inhibitorias, distribuyéndose radialmente en la capa granular y en la capa glomerular del BO (Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002). Las células del tipo B tienen filamentos intermedios

formados por la proteína GFAP, correspondiendo fenotípicamente con los astrocitos (Doetsch et al., 1997; Laywell et al., 2000). Estas células astrocíticas forman una envoltura con sus proyecciones rodeando a las cadenas de células del tipo A, que han sido denominados gliotubos. Las células tipo B expresan la GFAP, si bien los astrocitos son considerados de manera convencional como elementos de soporte en el cerebro adulto, algunas células de tipo B de la SVZ, poseen características de NSCs (Doetsch et al., 1997; Laywell et al., 2000). Cabe señalar que las células de tipo B, provienen de un linaje embriogénico con capacidad multipotente de generar precursores neuronales (Merkle and Alvarez-Buylla, 2006). Así mismo las células de tipo B rodean a las cadenas que forman las células de tipo A, dando origen a precursores transitorios de división rápida (células de tipo C) (Doetsch et al., 1997). Las células de tipo C o células precursoras, cuyas características ultraestructurales son muy similares a las células de tipo A, actúan como amplificadores, que producen finalmente neuroblastos migratorios (Doetsch et al., 1997). Las células endociliares o de tipo E, poseen una forma cuboidal y se organizan en una monocapa celular estableciendo múltiples contactos con sus células vecinas, mediante uniones estrechas (GAP junctions), divide la cavidad ventricular y el parénquima nervioso, poseen numerosos cilios así como numerosas vellosidades (Doetsch et al., 1997). No se han observado procesos mitóticos de estas células pero sabemos que juegan un papel importante en los denominados “nichos neurogénicos” y en la migración de las nuevas células al BO (Doetsch et al., 1997).

Los principales agentes mitogénicos usados para la promover la proliferación de las NSC de la SVZ *in vitro*, son el factor-2 de crecimiento de fibroblasto (FGF-2, por sus siglas en inglés) y el factor de crecimiento epidermal (EGF, por sus siglas en inglés) (Morita et al., 2005). En estudios realizados en ratones knock-out para los receptores EFG (EFGR) y FGF-2 (FGFR), se reportó una reducción significativa en la neurogénesis de la SVZ (Tropepe et al., 1997; Zheng et al., 2004). Otros candidatos posiblemente implicados en la regulación de la SVZ, son el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), esta molécula incrementa la proliferación de la SVZ y la neurogénesis del BO (Zigova et al., 1998), así como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEFG), promotor de la angiogénesis en la SVZ y que se ha relacionado con un incremento en la neurogénesis (Jin et al., 2002).

Un importante promotor de la supervivencia celular es la comunicación sináptica que establecen las nuevas células, con neuronas locales. La actividad sináptica suele ser mediante neurotransmisores clásicos como el glutamato, la acetilcolina y la serotonina (McTavish et al.,

2012). Para la integración de las neuronas nuevas que arriban al BO es esencial la constante activación sensorial para la supervivencia de las neuronas nuevas (Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002). En el caso particular de las células granulares que se integran en el BO, estas requieren de un alto grado de conectividad sináptica para su supervivencia (Mori et al., 2009; Urban and Arevian, 2009).

El olfato es un sistema sensorial altamente conservado en los linajes biológicos, existiendo tanto en invertebrados como en vertebrados (Buck, 1996). El sistema olfatorio detecta, procesa y transmite información química presente en el ambiente (Buck, 1996; Shepherd, 1972). Las moléculas que detecta el sistema olfatorio pueden dividirse acorde a su naturaleza en dos, volátiles y no volátiles (Berghard et al., 1996). El sistema olfatorio desempeña un papel crucial en la localización de alimento, la identificación de una pareja potencial y poder identificar posibles amenazas como la presencia de un depredador o bien de un alimento en descomposición (Buck, 1996; Shepherd, 1972). El procesamiento de la información química se lleva a cabo de manera sinérgica en dos estructuras ubicadas en la cavidad nasal, una es el órgano vomeronasal (OV) y la otra es el epitelio olfatorio (EO). De manera clásica se ha asociado al OV con la detección de odorantes sexualmente relevantes y al EO con la detección odorantes comunes (Berghard et al., 1996; Buck, 1996). Sin embargo, estudios recientes han aportado evidencia que indica una comunicación directa entre ambos sistemas olfatorios (Larriva-Sahd, 2008; Xu et al., 2005). Ambos sistemas poseen estructuras que transducen, procesan y proyectan a estructuras olfatorias distintas (Buck, 1996; Shepherd, 1972), por esta razón describiremos a ambos sistemas de manera separada.

8.2. EL SISTEMA OLFATORIO PRINCIPAL

El sistema olfatorio principal se encarga de transducir, procesar y transmitir la información relacionada con olores comunes (Buck, 1996), se origina en el epitelio olfatorio y continua en el bulbo olfatorio principal (BOP), una estructura que abarca dos tercios del bulbo olfatorio. Las neuronas de proyección envían sus axones hacia cortezas olfatorias ascendentes como el tubérculo olfatorio, la corteza piriforme y el sistema límbico (la corteza entorrinal medial, la amígdala cortical anterior/posterolateral y el hipocampo) (Buck, 1996; Nieuwenhuys, 1967).

El sistema olfatorio principal inicia en la cavidad nasal en unas estructuras laminares denominadas turbinas, lugar donde se ubica el epitelio olfatorio (EO) (Buck, 1996; Nieuwenhuys, 1967; Shepherd, 1972). La entrada del aire cargado con los odorantes del ambiente se distribuye a lo largo de estas láminas, propiciando el contacto de los odorantes con el EO (Buck, 1996; Nieuwenhuys, 1967; Shepherd, 1972). El EO es un epitelio pseudoestratificado, donde se encuentran las células sustentaculares, las células basales y las neuronas sensoriales olfatorias (nSO) (Buck, 1996; Shepherd, 1972). La detección y transducción de las señales olfatorias a impulsos eléctricos, se lleva a cabo por las neuronas nSO (Buck, 1996; Nieuwenhuys, 1967; Shepherd, 1972). Se ha propuesto la existencia de alrededor de 1000 receptores olfatorios distintos en los roedores (Shepherd, 1972); acorde a los experimentos realizados por Guthrie y cols., (1993). Ellos sugieren que las nSO poseen una curva de sintonía olfatoria a moléculas con un alto grado de similitud, es decir mientras más similar sea la molécula mayor probabilidad de respuesta tendrá la nSO (Guthrie et al., 1993). Las nSO son células bipolares ciliadas en el ápice, zona donde hacen contacto los odorantes y sus respectivos receptores olfatorios, los axones amielínicos de éstas células forman el nervio olfatorio, el cual atraviesa la placa cribiforme y hacen contactos específicos acorde a su receptor en estructuras esféricas llamadas glomérulos ubicados en el bulbo olfatorio principal (Buck, 1996; Shepherd, 1972).

8.2.1. EL BULBO OLFATORIO PRINCIPAL

El primer relevo de la información olfativa es el bulbo olfatorio principal (BOP), está conformado por siete capas claramente definidas, distribuidas de forma ovoide y concéntricas (Fig. 2A) (Buck, 1996; Nieuwenhuys, 1967; Shepherd, 1972). La primera capa está formada por el nervio olfatorio (Buck, 1996; Nieuwenhuys, 1967; Shepherd, 1972). La segunda capa llamada capa glomerular, está conformada por las dendritas de las neuronas de proyección, de los somas de las interneuronas periglomerulares, circunscritos en cuerpos esféricos denominados glomérulos (Buck, 1996; Nieuwenhuys, 1967; Shepherd, 1972). La tercera capa es la plexiforme externa, sitio donde se encuentran los plexos dendríticos de las neuronas de proyección, así como de grupos de neuronas empenachadas (Buck, 1996; Nieuwenhuys, 1967; Shepherd, 1972). La cuarta capa recibe el nombre de capa de las células mitrales, ya que en este sitio se encuentran de manera predominante los somas de las neuronas de proyección llamadas células

mitrales (MCs, por sus siglas en inglés) (Buck, 1996; Nieuwenhuys, 1967; Shepherd, 1972). La quinta capa es la llamada plexiforme interna, espacio donde se encuentran los axones de las neuronas de proyección (Buck, 1996; Nieuwenhuys, 1967; Shepherd, 1972). En la sexta capa llamada capa de las células granulares, es en donde se encuentra la mayor abundancia de éstas células densamente agrupadas en forma de racimos (Price and Powell, 1970). También en esta capa se pueden identificar otros tipos de interneuronas en menor grado, como las células de Golgi, Cajal, Blanes entre otras (Mori et al., 2009; Price and Powell, 1970; Shepherd, 1972). A la capa granular se le considera como un sitio integrador entre las diversas capas, siendo esencial en la organización y el procesamiento de la información entrante y saliente (Mori et al., 2009; Price and Powell, 1970; Shepherd, 1972). La séptima capa corresponde a una zona ocupada por los axones de las neuronas de proyección (mitrales y empenachadas), así como de las proyecciones corticales de las neuronales provenientes de regiones corticales (Mori et al., 2009; Price and Powell, 1970; Shepherd, 1972).

La presencia de un odorante puede activar a uno o más receptores olfatorios, de los más de 1000 propuestos (Buck, 1996). Estos receptores se encuentran acoplados a una proteína G_{olf} , cuyas vías de señalización desencadenan un incremento en los niveles de inositol-trifosfato (IP3) y de adenosín-monofosfato-cíclico (cAMP), activando canales de calcio (Boekhoff et al., 1990). El incremento del calcio intracelular, promueve la despolarización de las neuronas sensoriales facilitando la generación de potenciales de acción (Boekhoff et al., 1990; Buck, 1996). Ya en el BOP la información olfatoria, transducida en potenciales de acción por las neuronas sensoriales, converge en glomérulos específicos de acuerdo al receptor olfatorio que expresan las neuronas sensoriales, manteniendo así una “olfatotopía” (Buck, 1996; Guthrie et al., 1993; Mori et al., 2009). La activación espacio-temporal de glomérulos específicos ante un odorante, es a lo que se le ha llamado “mapas olfatorios” (Buck, 1996; Guthrie et al., 1993). Se ha demostrado que aun cuando existen glomérulos específicos a un receptor olfatorio, este mismo glomérulo puede participar en distintos mapas olfatorios (Guthrie et al., 1993). En la capa glomerular del BOP, se encuentra dos microcircuitos: el intraglomerular conformado por las terminales axónicas del nervio olfatorio, las dendritas de las neuronas de proyección y las células periglomerulares (Buck, 1996; Nieuwenhuys, 1967; Shepherd, 1972); el interglomerular conformado por las dendritas secundarias de las neuronas mitrales y las dendritas de las células granulares (Buck, 1996; Nieuwenhuys, 1967; Shepherd, 1972).

8.2.1. LOS NÚCLEOS OLFATORIOS DEL SISTEMA OLFATORIO PRINCIPAL

Se entienden como centros olfatorios del sistema olfatorio principal, a aquellas estructuras que reciben eferencias directas del bulbo olfatorio principal (Haberly and Price, 1978). Las principales estructuras que participan en el procesamiento olfatorio principal son: el núcleo olfatorio anterior (AON), el núcleo cortical anterior (ACN), el tubérculo olfatorio (OT), el núcleo cortical posterolateral amigdaloides (PLCN), la tenia tecta (TT), la corteza piriforme (PIR) y la corteza entorrinal (EC) (Fig. 2B) (Dulac and Wagner, 2006). Como podemos apreciar, algunas de las estructuras como son la corteza entorrinal y el hipocampo, no son consideradas como áreas de la paleocorteza, sino más bien son una transición entre ésta y la neocorteza (Krettek and Price, 1977a, b). Dentro de estas estructuras existe una gran comunicación ipsilateral entre ellas, ha este tipo de comunicación se le ha denominado de asociación (Haberly and Price, 1978). Existe una baja comunicación contralateral, a través de conexiones comisurales entre estructuras, a pesar de ello es suficiente la activación olfativa de un lado para generar una respuesta de aprendizaje generalizado (Mainland et al., 2002).

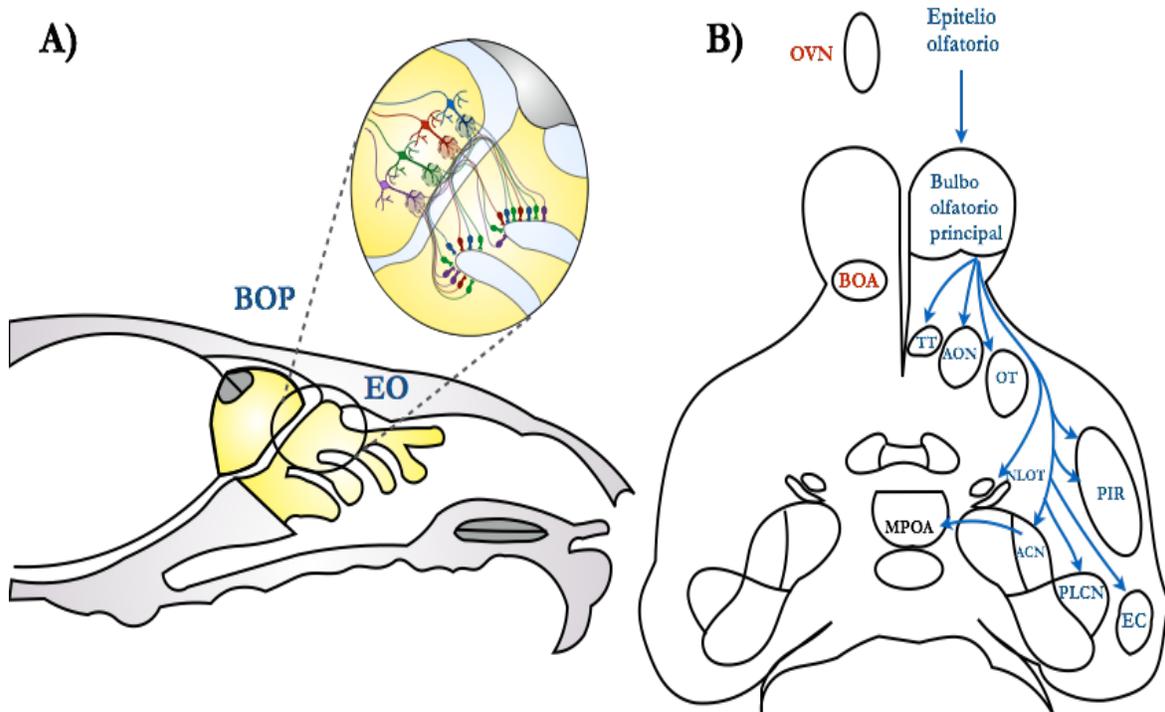


Figura 2.- Representación del sistema olfatorio principal en el roedor y sus núcleos olfativos superiores. **A)** Plano sagital de un cráneo de una rata, donde se puede observar la disposición del epitelio olfativo (EO) y el bulbo olfativo principal (BOP) en color amarillo, igualmente se pueden apreciar los contactos que establecen las neuronas sensoriales y las neuronas de proyección dentro de los glomérulos en el bulbo olfativo principal (BOP). **B)** Conectividad del sistema olfativo principal con sus distintos núcleos superiores. Tenia tecta, **TT**; núcleo cortical anterior **AON**; tubérculo olfativo, **OT**; corteza piriforme, **PIR**; corteza entorrinal, **EC**; área preóptica medial **MPOA**; núcleo del tracto olfatorio lateral, **NLOT**; núcleo cortical anterior, **ACN**; núcleo cortical posterolateral amigdalóide, **PLCN** (Adaptado de Dulac & Wagner 2006).

8.3. EL SISTEMA OLFATORIO ACCESORIO

El sistema olfatorio accesorio por su parte, transduce, procesa y transmite principalmente la información química procedente de odorantes sexualmente relevantes (Berghard et al., 1996). Comienza con el epitelio vomeronasal (EV), dispuesto en el interior del órgano vomeronasal (OV) o también llamado órgano de Jacobson (Jacobson et al., 1998). El OV es un saco ciego y por tanto aislado de la corriente respiratoria ubicado en la porción lateral del hueso vómer (Weiler et al., 1999). Al igual que el epitelio olfatorio (EO), el EV está conformado por tres tipos celulares, las células de soporte, las células sustentaculares y las neuronas sensoriales vomeronasales (VRNs) (Weiler et al., 1999). Tal y como ocurre en el

sistema olfatorio principal, las VRNs son sustituidas continuamente por células troncales basales (Weiler et al., 1999). A diferencia de las neuronas sensoriales del EO, las VRNs, poseen microvellosidades y no cilios (Nieuwenhuys, 1967). En el caso particular de los receptores vomeronasales, se han descrito alrededor de 300 receptores, clasificados en dos familias los V1R y los V2R (Scalia and Winans, 1975; Speca et al., 1999), los cuales poseen siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G_i y G_o respectivamente (Scalia and Winans, 1975; Speca et al., 1999). La distribución de los receptores V1R se encuentra en las neuronas del lumen del OVN, mientras que los receptores V2R se ubican en las neuronas basales del OV (Scalia and Winans, 1975; Speca et al., 1999). La representación diferencial de las neuronas en el OVN se conserva en el bulbo olfatorio accesorio (BOA), ya que los axones de las neuronas que expresan el V1R proyectan a glomérulos en la porción rostral del BOA, mientras que las neuronas que expresan el V2R proyectan hacia los glomérulos de la porción caudal del BOA (Scalia and Winans, 1975; Speca et al., 1999).

Los mecanismos de transducción de los VRNs se distinguen de los receptores del epitelio olfatorio, al no poseer canales iónicos dependientes de nucleótidos cíclicos (Liman and Corey, 1996). La principal vía que desencadena la activación los receptores VRNs, es la vía del IP_3 , por activación de proteínas G, el IP_3 activa canales de calcio de tipo TRP2 (canal-receptor de potencial transitorio) (Liman and Corey, 1996; Liman et al., 1999). Los registros electrofisiológicos de VRNs indican que sus receptores exhiben una actividad espontánea baja, así como una respuesta lineal con respecto a la intensidad de estimulación aplicada, una notable diferencia a los receptores olfatorios, que son rápidamente adaptables. Esto parece determinar que los VRNs codifican de manera diferente los estímulos feromonales, permitiendo que perdure por mucho más tiempo el estímulo (Jacobson et al., 1998). Esto es congruente con el tiempo que requieren los estímulos feromonales para inducir respuestas endocrinas en el roedor (Rosser et al., 1989).

8.3.1. EL BULBO OLFATORIO ACCESORIO

El siguiente relevo de la información del OVN es el bulbo olfatorio accesorio (BOA), una estructura ubicada en el último tercio del bulbo olfatorio, que conserva una alta similitud en su citoarquitectura con respecto al bulbo olfatorio principal (BOP). Ya que está conformado por los axones de las VRNs que proyectan a alrededor de 10 a 20 glomérulos,

dentro del BOA cada célula mitral/empenachada puede establecer contacto con alrededor de 5-10 glomérulos (Mori, 1987). A su vez cada célula mitral/empenachada puede establecer contactos con otras neuronas de proyección aledañas mediante la interacción provista por las células granulares (Mori, 1987). Si bien el sistema vomeronasal cuenta con un número reducido de receptores en comparación a los receptores del sistema olfatorio principal, parece ser que lo crucial inicialmente es la detección del congénere y posteriormente la discriminación entre estímulos similares (Mori, 1987).

8.3.2. LOS NÚNCLEOS OLFATORIOS DEL SISTEMA OLFATORIO ACCESORIO

Las aferencias del BOA proyectan a estructuras sub-neocorticales, incluyendo estructuras como la amígdala medial (MeA), la parte cortical posteromedial de la amígdala (PMCN), la cama del núcleo de la estría terminalis (BNSTp) (Scalia and Winans, 1975). Estas estructuras proyectan a su vez hacia el hipotálamo ventromedial (VMH) (Fig. 3) (Swanson and Petrovich, 1998). El sistema vomeronasal tiene proyecciones relativamente directas con centros hipotalámicos que controlan respuestas conductuales y endocrinas (Li et al., 1990). Es el hipotálamo medial quien está involucrado en el control de la conducta reproductiva, defensiva y de la ingesta de alimentos) (Bressler and Baum, 1996). Se ha reportado que la cópula induce la activación de marcadores genéticos de expresión temprana en los núcleos relacionados con el sistema vomeronasal que incluyen: la MeA, el BNSTp, el área preóptica medial (MPOA), el VMH y el núcleo arcuato (Fig. 3) (Bressler and Baum, 1996).

Las diferencias anatómicas entre ambos sistemas olfatorios son el reflejo de la naturaleza de los estímulos que procesan cada uno. El BOP tiene el papel de discriminar de entre una gran cantidad de variedades de olores provenientes del ambiente cambiante, sin perder la flexibilidad de asociarlos a respuestas conductuales. Por otro lado, el BOA posee un margen estrecho de estímulos al provenir de sus congéneres, estímulos que convergen en respuestas conductuales estereotipadas, al igual que sus respuestas fisiológicas, usualmente de tipo endocrinas (Bressler and Baum, 1996). Como se mencionó previamente a pesar de que los dos sistemas proyectan de forma independiente a estructuras centrales, están conectados en el bulbo (Vargas-Barroso et al., 2015; Xu et al., 2005), y ambos tiene la capacidad de percibir los distintos tipos de olores (Xu et al., 2005). A continuación se describirá una conducta fundamental para la sobrevivencia de las especies y en donde el olfato juega un papel fundamental.

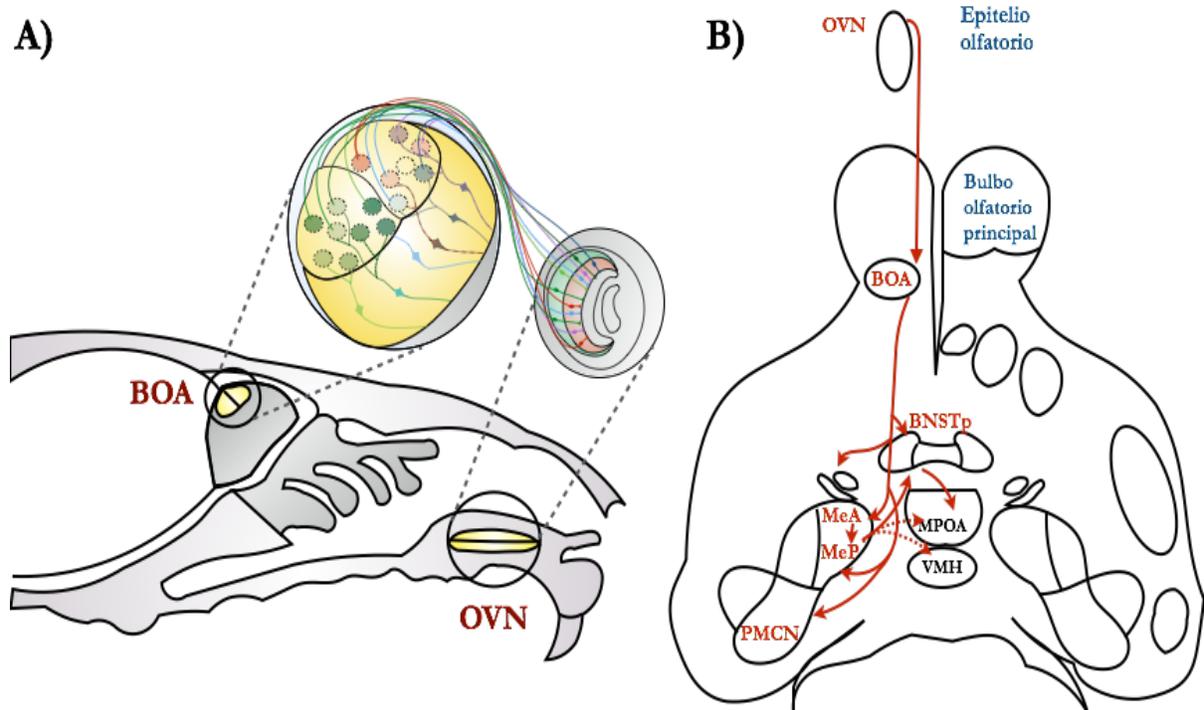


Figura 3.- Representación de la anatomía y distribución del sistema olfatorio accesorio en el roedor y sus núcleos olfativos superiores. A) Plano sagital de un cráneo de una rata, donde se puede observar la disposición del órgano vomeronasal y el bulbo olfativo accesorio (BOA) en color amarillo, así mismo se pueden apreciar los contactos que establecen las neuronas sensoriales vomeronasales y las neuronas de proyección dentro de los glomérulos en el BOA. **B)** Conectividad del sistema olfatorio accesorio con los distintos núcleos superiores. órgano vomeronasal **OVN**; bulbo olfativo accesorio **BOA**; núcleo del lecho de la estría terminal **BNST**; amígdala medial anterior y posterior **MeA/MeP**; núcleo cortical posteromedial amigdalino, **PMCN**; área preóptica medial, **MPOA**; hipotálamo ventromedial, **VMH** . (Adaptado de Dulac & Wagner, 2006)

8.4. LA CONDUCTA SEXUAL DE LA RATA

La conducta sexual en ambos sexos comprende una serie de complejos patrones motores que facilitan la transferencia exitosa del esperma del macho hacia el tracto reproductivo de la hembra. Debemos considerar a la conducta sexual como el resultado de la integración hormonal, sensorial, procesada y ejecutada por diversas estructuras cerebrales.

Los patrones conductuales desplegados por la rata macho se dividen en motivacionales y de ejecución, dentro de los motivacionales se encuentran la conducta de exploración, la delimitación del territorio con orina e inspección de la región vulvar de la rata hembra por parte del macho (Dewsbury, 1979). Mientras que las conductas de ejecución en el macho se caracterizan por el acercamiento hacia la hembra por los cuartos traseros, proseguido de tres patrones motores característicos: montas, intromisiones y eyaculación (Hull, 2006). El patrón motor denominado como monta se caracteriza por un acercamiento del macho hacia la hembra por los flancos traseros, en el cual él realiza una serie de movimientos pélvicos repetidos, sin existir una inserción del pene, posterior a esto el macho se retira de la hembra de una manera lenta (Hull, 2006). El término intromisión hace referencia al momento en el que el macho realiza un movimiento pélvico simple y profundo, desmontando de forma rápida y brusca, que va acompañado de una intromisión del pene (Hull, 2006). El último patrón conductual de ejecución es la eyaculación, este incluye una intromisión en la que se ejecuta un movimiento pélvico profundo que se mantiene durante unos cuantos segundos, momento en que se da la emisión espasmódica del líquido seminal desde el pene hacia el exterior, el macho suele extender sus extremidades superiores. Una vez que el macho ha eyaculado existe un periodo de inactividad o refractario, llamado intervalo post-eyaculatorio, que puede durar entre 5 a 7 minutos, una vez concluido este tiempo el macho puede reiniciar nuevamente la cópula (Hull, 2006).

La conducta sexual de la rata hembra se puede agrupar en dos categorías: conductas de proceptividad y de receptividad (Erskine, 1985). Las conductas proceptivas, son aquellas en la que la hembra realiza saltos, movimientos de las orejas, así como acercamientos hacia el macho o bien alejándose de él. Beach sugiere que estas conductas pueden ser asumidas como muestra de la iniciativa femenina para realizar la interacción sexual con el macho (Erskine, 1985; Whalen, 1974). La conducta de receptividad es cuando la hembra ejecuta el reflejo de lordosis, esta incluye una postura inmóvil extendiendo los miembros delanteros, flexionando la columna

dorsal, con ello la rata eleva la cabeza y desplaza la cola hacia un lado, con esta postura la hembra expone el canal vaginal para facilitar la intromisión del pene (Fig.4) (Erskine, 1985; Pfaff and Keiner, 1973)

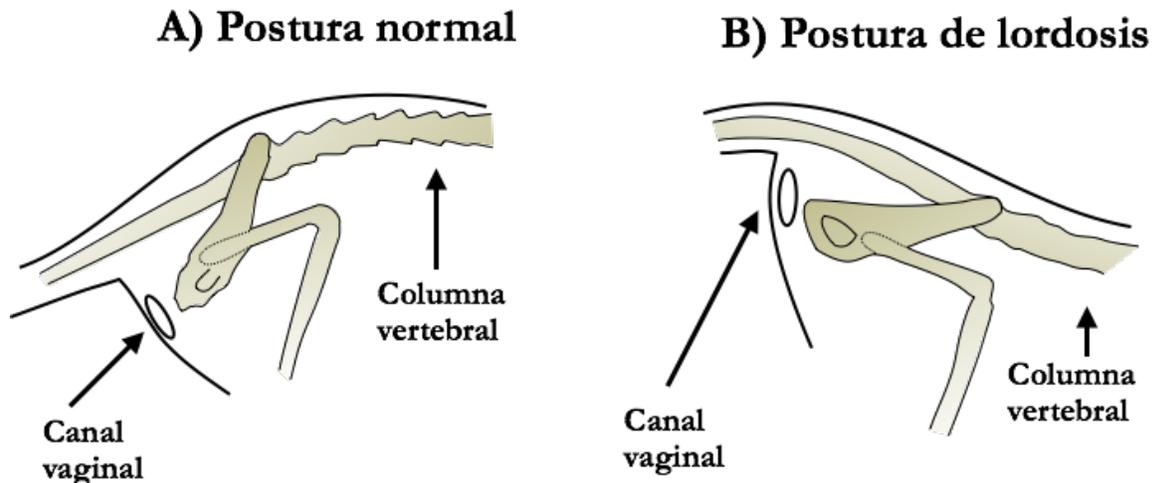


Figura 4.- Representación de los cambios posturales de la rata hembra durante la lordosis. A) Postura normal de los cuartos traseros de la rata hembra, nótese la orientación del canal vaginal en dirección al suelo. B) Postura clásica de la lordosis, en donde se aprecia la curvatura de la columna vertebral, así como el cambio de posición del canal vaginal de forma paralela al suelo. (Imagen adaptada de Nelson 2000).

Cabe señalar que la rata hembra puede manifestar diferentes grados en la postura de dorsiflexión de la columna: 0 = no existe dorsiflexión, 1 = la columna se muestra paralela al piso; 2 = existe una clara flexión del dorso que puede ir de intensa a muy intensa (Hardy and DeBold, 1972). Estos grados de dorsiflexión han sido usados para determinar la receptividad de la hembra mediante el coeficiente de lordosis (CL) y la intensidad media de lordosis (IML)(Erskine, 1985; Whalen, 1974). El resultado de todas estas conductas entre la rata macho y la hembra, se puede agrupar en el término de conductas copulatorias.

8.4.1. EL CICLO ESTRAL Y SU CONTROL ENDÓCRINO

La conducta sexual en la mayoría de los animales está bajo un estrecho control hormonal. Los primates, incluido el humano, poseen un ciclo llamado menstrual (*mensis*, mes), mientras que la mayoría de los mamíferos como es el caso de la rata hembra presentan un ciclo estral. El ciclo estral es particular para cada especie, en el caso de la rata, posee un periodo de 4-5 días, transitando por cuatro fases que son: proestro, estro, metaestro, diestro (Blaustein,

2007). Cada una de las fases tiene un control endócrino específico, dependiente en gran medida de las concentraciones circulantes de las hormonas estradiol y progesterona (Blaustein, 2007). El proestro, tiene una duración aproximada de 12 horas, momento en el que los niveles de estradiol han alcanzado su pico máximo, aunado con la liberación pulsátil de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH). Esto promueve la subsecuente liberación de las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH), induciendo las condiciones para la ovulación. El estro dura entre 9 y 15 horas, cuando los niveles de progesterona se incrementan al máximo a diferencia de los niveles de estradiol que se han reducido, la ovulación tiene lugar en este instante. El metaestro, tiene una duración de 24 horas tiempo en el cual el cuerpo lúteo, una estructura remanente de la liberación del óvulo, comienza a producir progesterona incrementando su concentración. Por último, el diestro es la fase con mayor duración ya que abarca alrededor de cincuenta y seis horas, en este periodo comienzan a incrementar los niveles de FSH promoviendo el desarrollo de nuevos folículos en el ovario y también el incremento gradual de la concentración de estradiol (Blaustein, 2007; LeFevre and McClintock, 1988) (Fig. 5). La identificación de cada fase del ciclo estral, puede corroborarse de forma sencilla y clara, por medio de un frotis vaginal, en donde observando las características de las células del epitelio al microscopio podemos llegar a concluir con alto nivel de precisión en qué fase se encuentra la hembra (Allen, 1931).

Como se puede observar en la figura 5, es en la fase final del proestro cuando ocurren dos procesos cruciales, la ovulación y el despliegue de las conductas sexuales antes mencionadas. Diversos trabajos han reportado una estrecha relación en estos tres elementos: hormonas, ovulación y conducta sexual, a tal punto que se sabe que el pico de estradiol que antecede 24 horas aproximadamente a la ovulación es fundamental para el despliegue de las conductas proceptivas, mientras que el pico de progesterona 5 horas previas a la ovulación es esencial para el despliegue de las conductas receptivas ya antes descritas (Blaustein, 2007; LeFevre and McClintock, 1988). La remoción de los ovarios (ovariectomía) tiene como consecuencia la incapacidad de la rata hembra para presentar el ciclo estral y para desplegar la conducta sexual, demostrando la relevancia de las hormonas sintetizadas en los ovarios en el despliegue de esta conducta (Blaustein, 2007; LeFevre and McClintock, 1988). El reemplazo hormonal con benzoato de estradiol (BE) y progesterona (P4), restaura las conductas sexuales desplegadas en la fase del proestro.

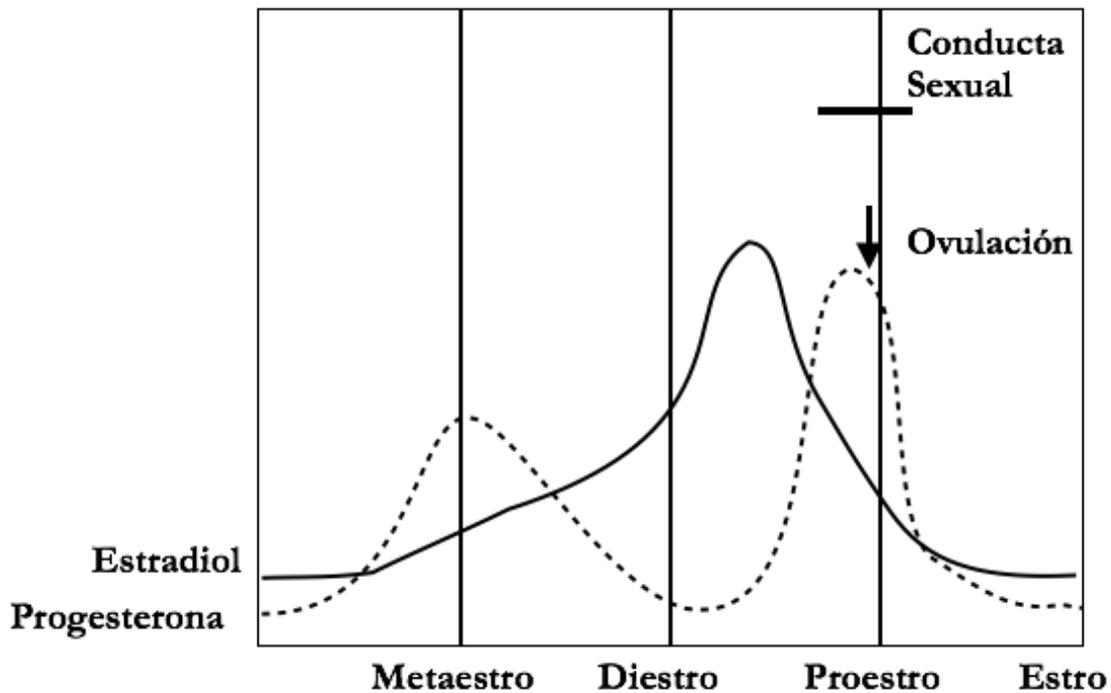


Figura 5.- Control endocrino del estradiol y la progesterona durante el ciclo estral de la rata hembra. La línea continua muestra los niveles de estradiol, mientras que la línea punteada indica los niveles de progesterona, la flecha señala el momento de ovulación y la línea superior a ella, representa la ventana de tiempo en que se despliegan las conductas sexuales de la rata hembra. (Imagen adaptada de Blaustein & Mani, 2007)

8.4.2. CONTROL NEURONAL DE LA CONDUCTA SEXUAL

El control hormonal sobre la conducta sexual tiene distintos blancos neuroanatómicos, uno de ellos se ubica en el hipotálamo, en el núcleo ventromedial (VMH) (Fig. 6) (Whalen, 1974). Esta estructura es crítica para la expresión de la conducta sexual en la hembra, ya que su estimulación eléctrica facilita la conducta receptiva, y su ablación bilateral produce la incapacidad de ejecutar la lordosis, inclusive aún con suplemento de estradiol y progesterona, en ocasiones esta lesión incrementa el número de agresiones hacia el macho (Pfaff and Sakuma, 1979). Experimentos realizados por el grupo de Barfield, demostraron que inyecciones *in situ* de estradiol en el VMH, seguida de una inyección de progesterona sistémica, promovía las conductas proceptivas y receptoras en hembras ovariectomizadas (Rubin and Barfield, 1980), de igual forma que una inyección local de progesterona en el VMH, antecedido por una inyección sistémica de estradiol (Pleim and Barfield, 1988). En un trabajo realizado

por el grupo de Sakuma (1987) estimularon el VMH y registraron en la sustancia gris periacueductal (PAG), de ratas ovariectomizadas, antes y después de una inyección de estradiol en el VMH. Comprobaron que el estradiol incrementa la excitabilidad de las neuronas del VMH y con ello la sensibilidad de las neuronas del PAG (Sakuma and Akaishi, 1987). Otros trabajos detectaron con la técnica de autoradiografía, la presencia del receptor a estrógenos también en otras regiones como el MPOA, la amígdala y en el septum lateral (Pfaff, 1988).

8.4.3 ADAPTACIONES FISIOLÓGICAS INDUCIDAS POR LA EXPERIENCIA SEXUAL

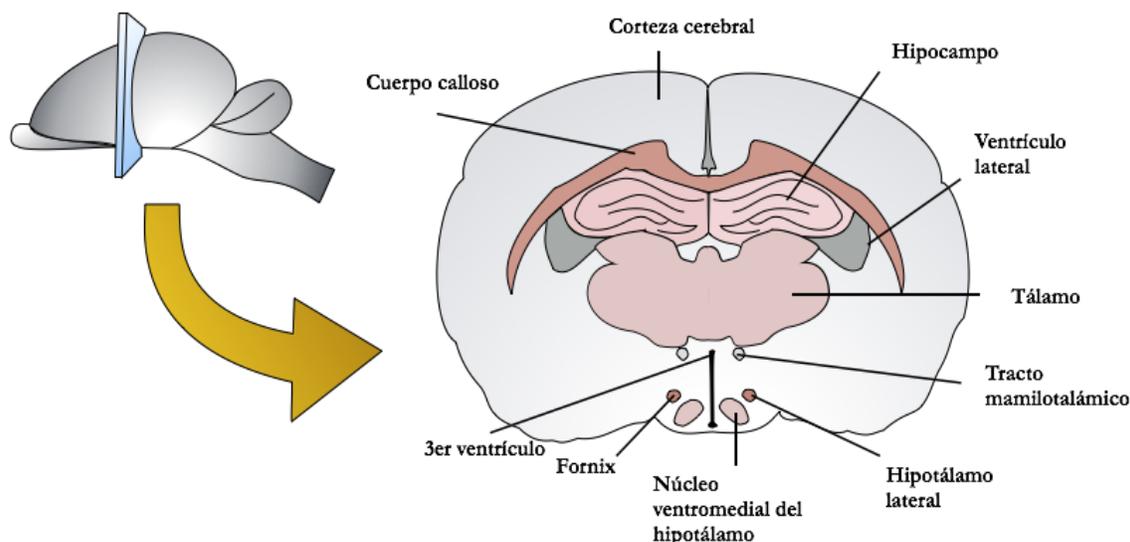


Figura 6.- Localización del núcleo ventromedial del hipotálamo en el cerebro de la rata hembra. La manifestación de las conductas receptoras de la rata hembra depende en parte del núcleo ventromedial del hipotálamo.

La experiencia sexual en la hembra se puede definir como la cantidad de interacciones sexuales recibidas por parte del macho, en gran medida determinada por la estimulación vagino cervical (VCS) provocada por las montas, intromisiones y eyaculaciones por el macho (Meerts et al., 2014). En la naturaleza como en condiciones de laboratorio las ratas hembra pueden controlar la frecuencia de la estimulación copulatoria, a esto se le llama regular la cópula o cópula regulada (McClintock and Adler, 1978). Se ha reportado que la cópula regulada induce una serie de adaptaciones fisiológicas, entre las que destacan mayor éxito reproductivo (Diamond, 1970), generación de estados afectivos positivo (Paredes and Alonso, 1997), un incremento en

la liberación de la hormona luteinizante, oxitocina y prolactina asociadas a la ovulación y preñez (Blake and Sawyer, 1972; Terkel and Sawyer, 1978). Además, el despliegue de conducta sexual aumenta la expresión de c-fos en diversos núcleos relevantes para la cópula como la MeA, el MPOA y el núcleo NAcc (Erskine and Hanrahan, 1997), así como cambios plásticos y neurogénesis (Arzate et al., 2013; Corona et al., 2011).

8.4.3.1 LA COPULA REGULADA (CR) Y LA NEUROGENESIS

Como ya se mencionó, varias líneas de investigación han demostrado que la rata hembra tiene la capacidad de regular y espaciar los contactos copulatorios que recibe en una interacción sexual (para una revisión ver (Paredes, 2009)). Esto ocurre normalmente en condiciones semi-naturales o naturales y puede estudiarse en el laboratorio cuando las hembras se observan en las condiciones adecuadas. En nuestro laboratorio estudiamos la conducta sexual en dos modalidades, cópula regulada por la hembra “pacing” (CR), y la cópula no regulada por la hembra “no-pacing” (CNR) (Arzate et al., 2013; Corona et al., 2011). En el caso de la cópula regulada por la hembra, la caja de cópula cuenta con una barrera de acrílico que la divide en dos compartimentos, en uno se coloca al macho y en otro a la hembra, adicionalmente la barrera de acrílico cuenta con un espacio en la parte inferior por donde puede pasar únicamente la rata hembra que es de menor tamaño que el macho. Cuando estudiamos la cópula no regulada por la hembra (CNR), la caja de cópula no cuenta con la barrera de acrílico, por lo que el macho y la hembra se encuentran en un único compartimento. En la CR la hembra es quien determina la frecuencia y el número de los estímulos sexuales, escapando del compartimento del macho hacia el compartimento libre, mientras que en la CNR es el macho quien regula la frecuencia y el número de contactos copulatorios (Corona et al., 2011). Ambos paradigmas copulatorios promueven respuestas conductuales distintas en la hembra y en el macho, como lo son en el número de montas, número de eyaculaciones y en la frecuencia con que realizan intromisiones por parte del macho. Cuando la hembra regula los contactos copulatorios, recibe menos montas, menos eyaculaciones y una frecuencia menor de intromisiones por serie eyaculatoria, mientras que en la CNR ocurre lo contrario (Corona et al., 2011; Paredes and Vazquez, 1999)

La CR y la CNR por la hembra, además de presentar patrones conductuales distintos, también tienen como consecuencia cambios fisiológicos y citológicos (Erskine et al., 2004). En

experimentos previos realizados por nuestro grupo de trabajo se demostró que la CR produce un estado afectivo positivo (estado hedónico) en la hembra (Paredes, 2009), aspecto que no ocurre en la cópula no regulada, esto fue evaluado con la tarea de preferencia de lugar condicionado (PLC) (Arzate et al., 2013).

Otra característica importante de la cópula regulada es que aumenta de manera significativa la cantidad de células nuevas en el bulbo olfatorio principal y accesorio (Corona et al., 2011). En este mismo sentido, experimentos previos de nuestro laboratorio determinaron que el aumento en el número de células en el bulbo olfatorio está relacionado con el número de sesiones de cópula regulada realizadas por la hembra. Las ratas hembra que fueron expuestas a cuatro sesiones de cópula regulada (CR-4S), tuvieron un mayor número de células inmunorreactivas para BrdU, en comparación con aquellas hembras que solo realizaron una sesión de cópula (CR-1S) (Arzate et al., 2013). Cabe señalar que ambos grupos experimentales fueron sacrificadas 16 días después de haber sido inyectadas con el marcador mitótico BrdU. Posteriormente, experimentos realizados por Ortiz et al., (en preparación.) evaluaron la supervivencia en el bulbo olfatorio a los 45 días después de ser inyectados con BrdU, manteniendo los grupos de CR-1S y CR-4S, sin encontrar diferencias en el número de células en ambos grupos. De esta manera estos resultados sugieren que el incremento celular que ocurre a los 16 días provocado por las cuatro sesiones de cópula, no son suficientes para el mantenimiento de las nuevas células al cabo de 45 días. Es por esta razón en el presente trabajo nos propusimos extender el número de sesiones de cópula a 10 sesiones (CR10S), abarcando los 45 días descritos para la supervivencia e incorporación celular, con el objetivo de determinar si la repetición del mismo estímulo que las genera en la primera cópula, puede aumentar la supervivencia celular al día 45 y/o la diferenciación a neuronas.

9. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estudio de la neurogénesis como modelo de plasticidad neuronal ha tenido un gran auge en las últimas tres décadas. Actualmente se ha demostrado que en estructuras como el hipocampo y el bulbo olfatorio se incorporan neuronas nuevas de manera continua. Sin embargo, existen paradigmas conductuales que pueden incrementar el número de células que se incorporan a el bulbo olfatorio, como la conducta sexual. En nuestro laboratorio hemos estudiado el incremento en la neurogénesis que produce la conducta sexual en su modalidad de

cópula regulada por la rata hembra. En estudios previos, nuestro grupo de investigación se demostró que existe una relación entre el número de sesiones de cópula y el número de células que se incorporan a el bulbo olfatorio, encontrando que cuatro sesiones de cópula producen más células que una sola sesión, esto evaluado a los 16 días después de la primera experiencia sexual. Posteriormente al evaluar si el número de células encontradas a los 16 días se conservan hasta los 45 días (tiempo de incorporación a la red), se reportó que el número había descendido a niveles basales (Ortiz en preparación). Por lo que en el presente trabajo decidimos extender el número de sesiones de cópula regulada a un total de 10, abarcando los 45 días que requieren las células en el bulbo olfatorio para su incorporación. Con base en la literatura proponemos que la estimulación sexual repetida durante 10 sesiones, podrá incrementar y/o mantener el número de células originadas en la primera sesión de cópula.

10. HIPÓTESIS

La cópula regulada repetida durante el periodo de incorporación de las neuronas nuevas en el bulbo olfatorio provocará mayor supervivencia de las células originadas por la primera cópula.

11. OBJETIVO DEL PROYECTO

Determinar el efecto de la cópula repetida (10 sesiones), sobre la integración de neuronas nuevas en la BO de la rata hembra 45 días después de la primera cópula.

11.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar si la cópula repetida (10 sesiones) promueve una mayor supervivencia de células y/o neuronas.
 - A) Cópula regulada
 - B) Cópula no regulada
- Evaluar si la exposición a un macho (sin contacto físico) promueve una mayor supervivencia de células y/o neuronas.
- Comprobar si las células originadas por la primera cópula son neuronas y se activan (c-fos), en respuesta a la estimulación sexual a los 45 días.

12. MÉTODOS

12.1. SUJETOS EXPERIMENTALES

Se utilizaron ratas hembra de la cepa wistar de 200 a 250 gramos, sin experiencia sexual y machos sexualmente expertos de 300-350 gramos, obtenidas de la colonia local del Instituto de Neurobiología, de la UNAM, mantenidas a una temperatura de 25°C. Las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de 30% ketamina (Procin) y 70% xilacina (Cheminova), en un volumen de 1ml/kg, para ser ovariectomizadas (OVX), para su recuperación se dio un plazo de 1 semana. Para inducir la receptividad sexual las ratas hembra, fueron suministradas con benzoato de estradiol (BE, 25µg/kg, Sigma Aldrich) y progesterona (P4, 1mg/kg), 48 y 4 horas, respectivamente, antes de cada sesión de conducta (Fig. 7). Este proceso consistentemente induce la expresión de conductas proceptivas y receptivas de la rata hembra (Martinez and Paredes, 2001). Las ratas hembra fueron distribuidas aleatoriamente en 5 grupos: 1) Grupo control (sin exposición sexual de ningún tipo); 2) Grupo de exposición ante un macho (sin posibilidad de contacto); 3) Cópula Regulada durante 5 sesiones en un intervalo de 16 días (CR5S); 4) Cópula Regulada por la hembra, durante 10 sesiones en un intervalo de 45 días (CR10S); 5) Cópula No regulada durante 10 sesiones en un intervalo de 45 días (CNR10S), todos los animales experimentales fueron sacrificados al día 45 después de la administración de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) (Fig. 7).

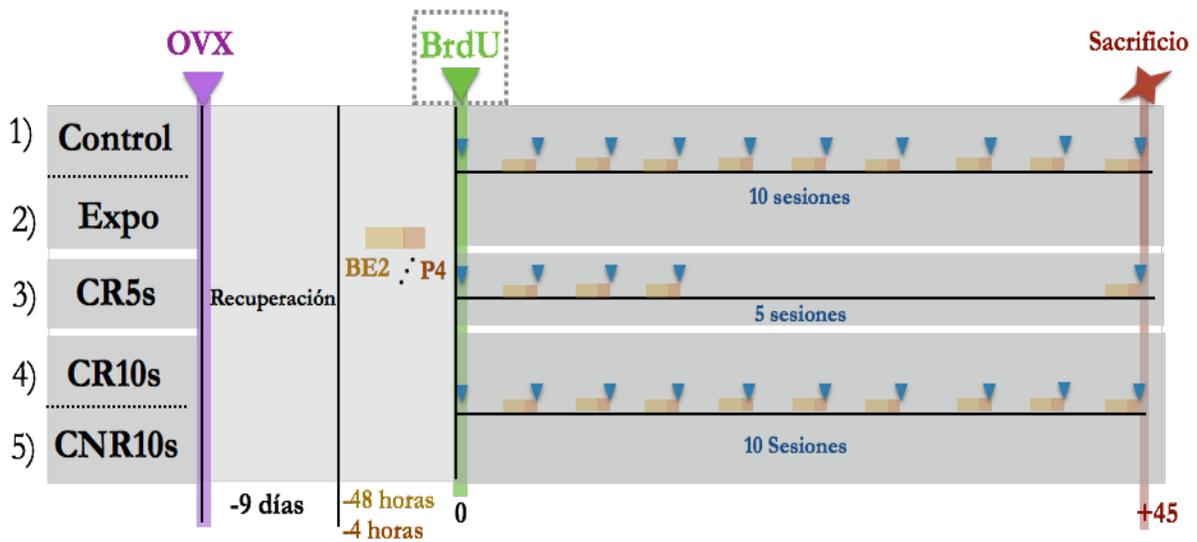


Figura 7.- Diagrama de los grupos experimentales con sus respectivas sesiones de conducta. Se muestran los cinco grupos experimentales, la línea verde indica la administración de BrdU y 45 días después el momento de sacrificio, representado con línea roja, por último las marcas azules representan cada sesión de conducta. **Ovx**, ovariectomía; **E2**, estradiol; **P4**, progesterona.

12.2. ADMINISTRACIÓN DE 5-BROMO-2'-DEOXIURIDINA (BRDU)

Con el objetivo de identificar a las células originadas por la conducta sexual, se utilizó un nucleósido análogo de la timina, llamado 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), el cual se incorpora en el ADN de las células en la fase de síntesis de la división celular. En la primera sesión conductual, se inyectó el BrdU (Sigma Aldrich), de manera intraperitoneal (i.p.) en tres inyecciones con una concentración de 100 mg/kg en una solución de NaCl al 0.9% (Corona et al., 2011). El protocolo de administración del BrdU inició con la primera inyección una hora antes de la primera prueba conductual, la segunda inyección fue aplicada inmediatamente al finalizar la tarea conductual, la última dosis se administró una hora después, para una dosis total de 300 mg/kg (Fig. 8).

En el caso del grupo de CR5s una vez concluida la 4 sesión de cópula se alojaron a los animales en su caja habitación hasta el día 45 para un último registro de cópula antes del sacrificio, concluyendo así 5 sesiones en total. Todos los animales fueron sacrificados el día 45 después de la primera prueba conductual y la inyección de BrdU.

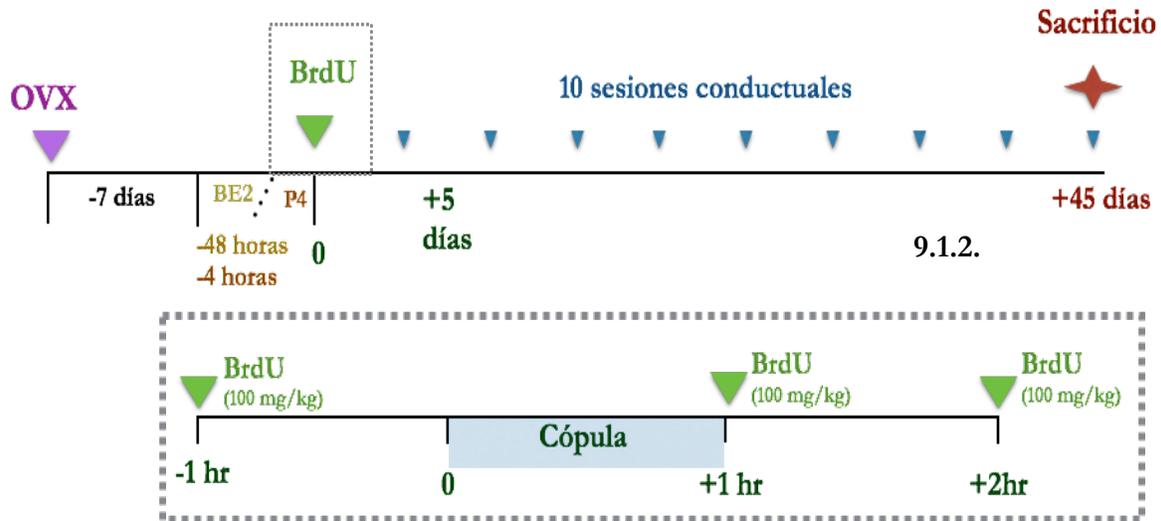


Figura 8.- Representación esquemática del protocolo de administración de BrdU. A) Tiempo transcurrido entre la ovariectomía (OVX), la suplementación hormonal (BE2 y P4) y la administración de BrdU en la primera sesión de cópula, así como el intervalo entre las pruebas conductuales cada 5 días. B) Protocolo de administración de BrdU una inyección una hora antes de la conducta, al finalizar y una hora después.

12.3. PROTOCOLO CONDUCTUAL DE LA CÓPULA REGULADA Y LA NO REGULADA

Las pruebas de conducta sexual contaron con una duración de una hora, para las pruebas conductuales se utilizaron, cajas de acrílico con dimensiones de 40 cm x 60 cm x 40 cm. En el caso de la CR, se colocó una barrera de acrílico en la parte central de la caja con un orificio de tamaño suficiente para permitir el paso de la hembra pero no del macho. La rata hembra de menor tamaño pudo pasar entre ambos compartimientos a voluntad controlando así la interacción sexual con el macho. Para las sesiones de CNR no se colocó la barrera de acrílico en la caja de conducta, permitiendo al macho controlar la frecuencia y el número de contactos sexuales, por lo que la hembra no puede regular los contactos sexuales (Corona et al., 2011).

Se registraron las conductas sexuales desplegadas por el macho como son: el número de montas, el número de intromisiones, y el número de eyaculaciones, la latencia de monta, la latencia de intromisión y la latencia de eyaculación, todos definidos como el tiempo requerido por el macho para realizar el primer evento sexual de cada tipo. También se calculó el intervalo

interintromisión (III), el cual resulta de dividir la latencia de eyaculación entre el número de intromisiones recibidas en cada serie eyaculatoria, cabe señalar que se hizo este análisis a todos los grupos con contacto sexual (Arzate et al., 2013).

Para determinar el nivel de receptividad de la hembra, se utilizó una clasificación adaptada de Hardy y DeBold (Hardy and DeBold, 1972) ante cada monta e intromisión del macho. Se asignó el valor cero, cuando la hembra no muestra cambio en la postura; el valor de uno, cuando la dorsiflexión es moderada, formando una línea paralela al suelo y por último, el valor dos, cuando la dorsiflexión es muy pronunciada y la cabeza tiene a elevarse hacia atrás (Fig. 9).

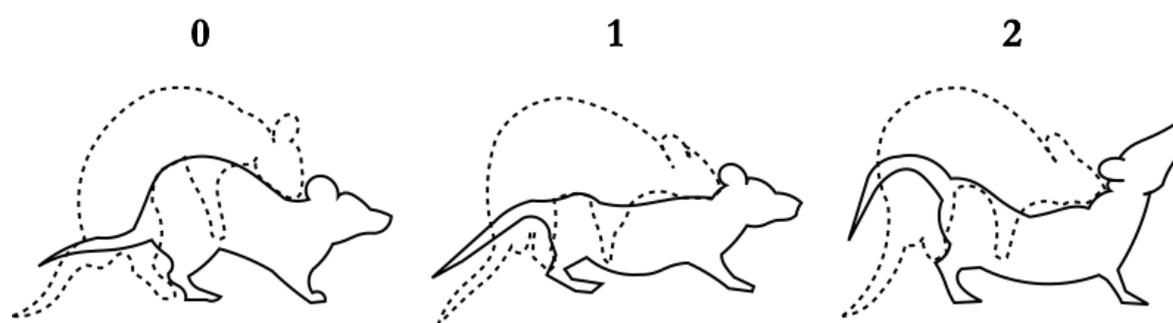


Figura 9.- Grado de dorsiflexión de la rata hembra ante un evento copulatorio del macho. El valor 0, corresponde a la ausencia de flexión; El valor 1, corresponde cuando el dorso de la rata es paralelo al piso; El valor 2, se atribuye cuando existe una clara curvatura del dorso y la cabeza de la rata dirigida hacia atrás. (Adaptado de Hardy & DeBold, 1972).

A partir del grado de dorsiflexión, se obtuvieron dos parámetros que son la intensidad media de lordosis (IML) y el coeficiente de lordosis (CL), definidos por las siguientes formulas.

$IML = \Sigma Pts L / \Sigma L$; Dónde ($\Sigma Pts L$) es la sumatoria del grado de lordosis dividido entre el total de lordosis registradas (ΣL).

$CL = \Sigma L / (\Sigma M + \Sigma I) * 100$; Dónde (ΣL) es la sumatoria de lordosis registradas, dividido entre la sumatoria del número total de montas (ΣM), más la sumatoria del número total de intromisiones (ΣI), multiplicado por 100.

Únicamente en los grupos de copula regulada (CR5s y CR10s), se evaluó la latencia de regreso después de una monta (LRM), la latencia de regreso después de una intromisión (LRI)

y la latencia de regreso después de la eyaculación (LRE). Los valores de cada latencia, se obtuvieron al restar del tiempo en que la hembra salió del compartimento del macho después de recibir una monta, una intromisión o eyaculación, el tiempo en que tardó la hembra en cruzar nuevamente al compartimento del macho. Se calcularon también el porcentaje de salidas realizadas después de una monta (%SDM), el porcentaje de salidas después de cada intromisión (%SDI) y el porcentaje de salida de eyaculaciones (%SDE), para ambos análisis se determinaron cuantas veces la hembra salió del compartimento del macho después de una monta, una intromisión o eyaculación, divididos entre el total de montas o intromisiones recibidas en la serie copulatoria y multiplicado por 100.

12.4. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES EXPERIMENTALES Y LA OBTENCIÓN DEL TEJIDO BIOLÓGICO

Después de 45 días de la administración de BrdU y 90 minutos después de la última prueba conductual (CR5s, CR10s, CNR10s), los sujetos experimentales fueron inyectados con una dosis letal de pentobarbital sódico (100 mg/kg, Cheminova) y posteriormente fueron perfundidos intracardiamente con una solución salina (250 ml de PBS a 0.2M, pH 7.4) seguida de paraformaldehído al 4% (300 ml, Sigma Aldrich en una solución de 0.1M de PBS). Los cerebros fueron extraídos y postfijados durante una hora en paraformaldehído, posteriormente fueron crioprotegidos con una solución de sacarosa al 30%, hasta ser cortados en un micrótopo (Leica, SM200R) (Arzate et al., 2013; Corona et al., 2011; Corona et al., 2016). Se realizaron cortes parasagiales de un hemisferio del cerebro, con un grosor de 30 μ m, los cuales se distribuyeron en tres series de 8 cortes, siempre abarcando el BO (principal y accesorio).

12.5. INMUNOHISTOQUÍMICA CONTRA BRDU

A partir de las tres series de cortes obtenidos por hemisferio de rata, procedimos a realizar una inmunohistoquímica para BrdU en cuatro rebanadas de 30 μ m por rata, seleccionando aquellas rebanadas que contenían al BOP y BOA. El procedimiento consistió en incubar las rebanadas en ácido clorhídrico 2N (J.T Baker) durante una hora a 37°C para desnaturalizar el ADN. Posteriormente las rebanadas fueron incubadas con borohidruro de

sodio (Sigma Aldrich) al 0.5% durante 15 minutos para neutralizar el ácido clorhídrico. Con el objetivo de evitar una posible inmunodetección inespecífica, el tejido fue bloqueado con una solución de albúmina (Sigma Aldrich) al 0.01% y Tritón X-100 (J.T. Baker) al 0.03%. Para la incubación del anticuerpo primario Anti-BrdU de ratón (BD Biosciences) se utilizó una concentración de 1:2000 en una solución de albúmina al 0.01% y Tritón X-100 al 0.032%, en agitación durante 16 horas a una temperatura de 4°C. Posteriormente los tejidos fueron incubados a temperatura ambiente durante 2 horas en el anticuerpo secundario biotinilado Anti-IgG de ratón (vector), a una concentración de 1:500 con albúmina al 0.01% y Tritón X-100 (0.032%). Para el proceso de detección y revelado se utilizó un kit de avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain) y una solución de diaminobenzidina al 0.6%, peróxido de hidrógeno al 0.072% y níquel al 10% (Corona et al., 2011; Corona et al., 2016) .

12.5.1. CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS INMUNORREACTIVAS A BRDU

A partir del tejido procesado con la técnica de inmunohistoquímica, se realizaron reconstrucciones fotográficas del bulbo olfatorio completo, obtenidas con un microscopio Olympus BX60F-3 con una objetivo de 10X. Se evaluó el número de células nuevas en el bulbo principal y en el accesorio. Para delimitar el área de cuantificación celular, se utilizó el programa de análisis de imágenes ImagePro 6.1, con el cual se delimitaron las áreas ópticas de interés (AOIs), representados por círculos de $400 \mu\text{m}^2$ y $200 \mu\text{m}^2$, para el BOP y el BOA respectivamente (Fig. 10). La disposición de los AOIs en el BOP fue de 3 círculos por cada capa abarcando, la capa glomerular (Gl), la capa mitral (M) y la capa granular (Gr). En el BOA se colocaron seis círculos por capa, incluyendo la capa glomerular (GL), la capa mitral (M) y la capa granular (Gr) (Corona et al., 2011) (Fig. 10). La cuantificación celular se realizó de manera semiautomática, en donde se identificaron aquellas células inmunorreactivas contra BrdU. Al finalizar las cuantificaciones nuestros resultados fueron reportados como el número de células nuevas por unidad de área, expresada en milímetros cuadrados por corte, de esta forma cada grupo experimental evaluado contó con un total de 7 ratas, de las cuales se analizaron 4 rebanadas por rata.

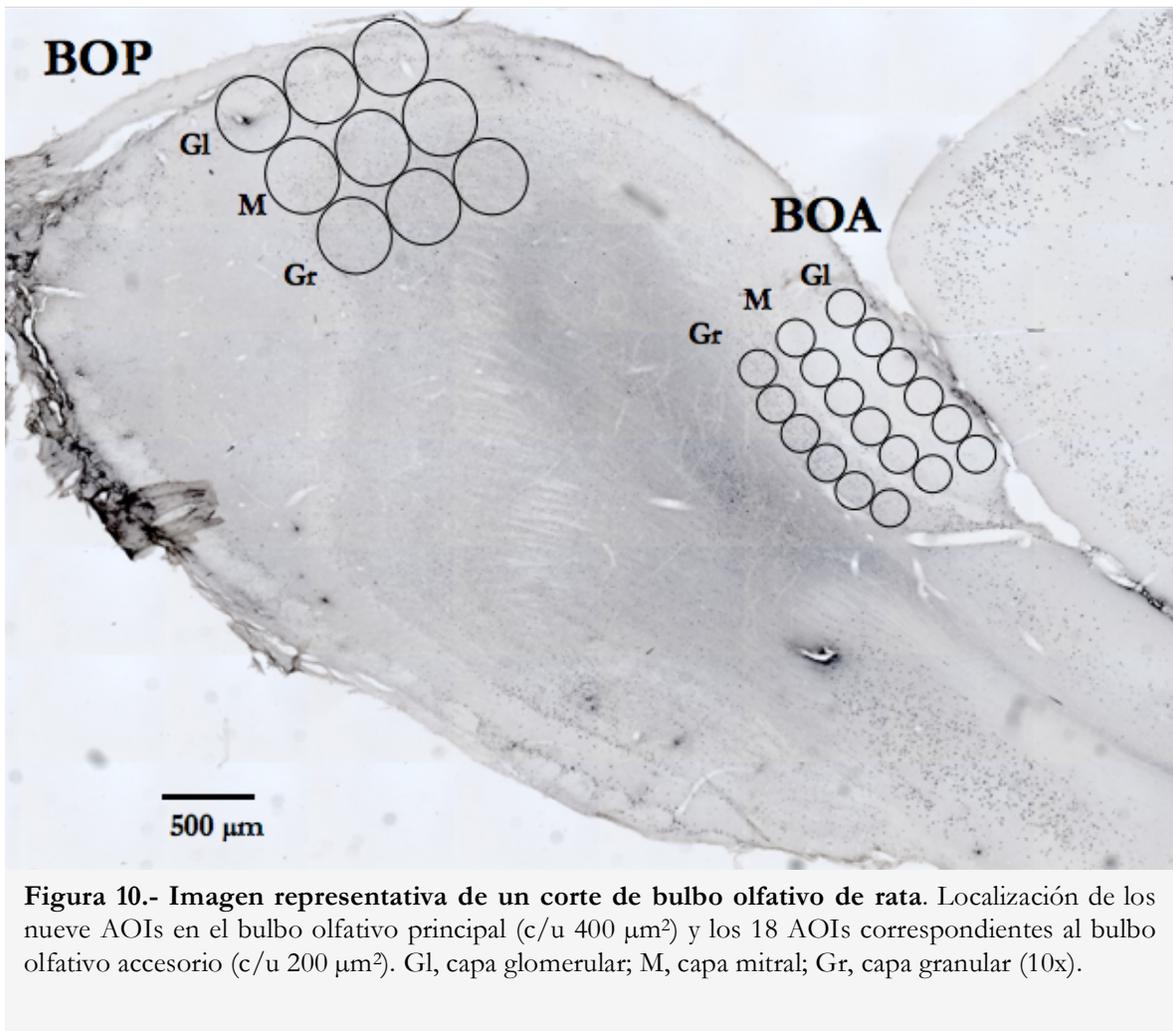


Figura 10.- Imagen representativa de un corte de bulbo olfativo de rata. Localización de los nueve AOIs en el bulbo olfativo principal (c/u 400 μm^2) y los 18 AOIs correspondientes al bulbo olfativo accesorio (c/u 200 μm^2). Gl, capa glomerular; M, capa mitral; Gr, capa granular (10x).

12.6. INMUNOFLORESCENCIA CONTRA BRDU, NEUN Y C-FOS

Para determinar el número de células que se diferenciaron a neuronas y su posible activación a los 45 días después de la primera cópula, se usó la técnica de inmunofluorescencia para los marcadores nucleares de BrdU (células nuevas), NeuN (marcador neuronal), c-fos (activación celular) (Tabla 1). Para identificar este último marcador, como ya se mencionó sacrificamos a los animales a los 90 minutos después de la última prueba de conducta, tiempo necesario para la expresión de c-fos (Portillo et al., 2013). Por lo que utilizamos un triple marcaje a partir del siguiente protocolo general, una de las series de cortes histológicos previamente obtenidas, fueron incubadas en ácido clorhídrico 2N durante 30 minutos a una temperatura de 37°C, después se incubaron en una solución de peróxido de hidrógeno al 1% por 30 minutos. Previo

a la incubación de los anticuerpos se utilizó una solución bloqueadora proveniente del TSA™ plus system (caseína) al 0.5% en TBS, durante 30 minutos como máximo. La incubación de los anticuerpos primarios fue en dos etapas, en la primera etapa se incubaron las rebanadas en el anticuerpo anti-BrdU (rata 1:800 AbD Serotec) y el anticuerpo anti-NeuN biotinilado (ratón 1:800, Chemicon), simultáneamente durante 48 horas a 4°C. Se reveló primero la marca de BrdU y para ello se utilizó un anticuerpo anti-rata unido a un Alexa-488 dye (verde, 1:1250 Invitrogene) durante 2 horas en cuarto oscuro, después se procedió con la detección de la marca de NeuN, por ello se empleó un kit de avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain), cuyo revelado se realizó mediante el kit de amplificación TSA™ plus Cyanine3 System (PerkinElmer), a una proporción de 100:1 del diluyente y del amplificador respectivamente, añadiendo un volumen de 5µl por rebanada en cámara húmeda en agitación durante 15 minutos máximo, una vez concluido este tiempo se realizaron lavados con TBS para después continuar con la segunda parte de la incubación del anticuerpo primario de c-fos (conejo 1:500 GeneTex) durante 48 horas cubierto con aluminio a 4°C, una vez concluido este tiempo se añadió el anticuerpo secundario (anti-conejo biotinilado IgG 1:1250 Vector BA-1000), para añadir nuevamente el kit de avidina-biotina-peroxidasa durante 30 minutos. Para finalizar se añadió el kit de amplificación TSA™ Cumarine System (100-300 slides) (PerkinElmer), nuevamente se utilizó un volumen de 5µl por rebanada en cámara húmeda por 15 minutos, dejando lavar en TBS a 4°C durante 24 horas adicionales para ser montados en portaobjetos con un medio de Aqua poly/Mount, Polysciences, Inc.

	Anticuerpo Primario	Anticuerpo Secundario	Detección/Revelado	
BrdU	Anti-BrdU rata 1:800		Anti-rata Alexa 488 1:1250	
NeuN	Anti-NeuN ratón biotinilado 1:800		Avidina-Biotina	Cyanine (Cy3) kit amplificación
c-fos	Anti c-fos Conejo 1:500	Anti-Conejo IgG biotinilado 1:1250	Avidina-Biotina	Cumarine kit amplificación

Tabla 1.- Anticuerpos usados para la detección de los antígenos de BrdU, NeuN y c-fos. El uso de estos anticuerpos correlaciona con la presencia de nuevas células, neuronas madura y actividad celular respectivamente.

12.6.1. CUANTIFICACIÓN CELULAR Y EL ANÁLISIS DE COLOCALIZACIÓN

El tejido que fue procesado para inmunodetección de la marca de BrdU, de NeuN y c-fos, posteriormente fue colocado en un microscopio confocal LSM 700 Zeiss, amplificado con un objetivo de 20x/0.8 Aplanachromat. Se utilizó el programa Zen Black para la adquisición de las imágenes del microscopio confocal, el protocolo consistió en una reconstrucción de imágenes de 5x5 abarcando las dos áreas de interés de manera independiente (BOP y BOA) (Fig. 11). Posteriormente se utilizó la herramienta “Z-stack” para la adquisición de las diferentes secciones ópticas, eligiendo como el centro de la rebanada, la región con más señal del canal A488 (color Verde, BrdU) y abarcando un total de 11 secciones, para todos los casos la intensidad del láser se mantuvo en un rango de entre 1% y 1.5%.

Una vez obtenida la imagen se procedió a determinar las AOIs tanto del BOP como del BOA, siendo la misma representación que en las imágenes de inmunohistoquímica, 3 círculos de 400 μm de diámetro por cada una de las tres capas del BOP (Gl, M, Gr) y 6 círculos de 200 μm , por las tres capas del BOA (Gl, M, Gr). En primer lugar se seleccionó el canal del láser 488 (verde), con el propósito de identificar las células BrdU positivas que coincidieron en las AOIs previamente ubicadas, a continuación se añadió el canal de láser 588 (rojo) para identificar los elementos neuronales y por último el canal de láser 405 (azul), para ubicar a las células con expresión de c-fos. Una vez analizados los tres canales, se determinó como el 100% todas aquellas células que tuvieron la marca de BrdU.

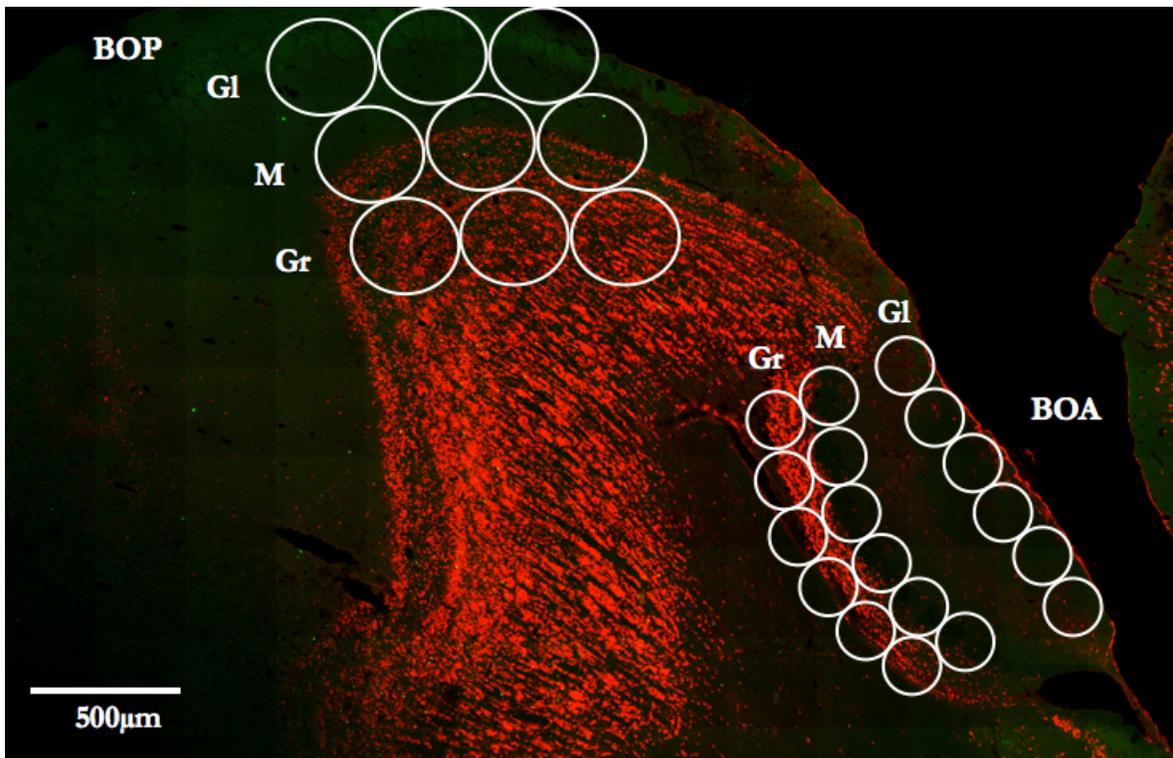


Figura 11. Reconstrucción fotográfica del bulbo olfatorio obtenida mediante microscopía confocal. Se observa la ubicación de los AOIs colocados en la porción del bulbo olfatorio principal (BOP, 400μm) y accesorio (BOA 200μm).

13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Dado que la mayoría de los datos no tenían homogeneidad de varianza y/o distribución normal utilizamos pruebas no paramétricas. Para las variables conductuales se utilizó una prueba Kruskal-Wallis, y en caso de encontrar diferencias significativas se realizó la prueba de Dunn como Post-hoc. Se utilizaron las mismas pruebas para los valores correspondientes a la inmunohistoquímica entre grupos. Por último, para determinar posibles diferencias significativas en las proporciones de células encontradas mediante microscopía confocal se utilizó una prueba Chi cuadrada (X^2). En todos los casos se consideró como valor significativo cuando el valor de $p \leq 0.05$. Las gráficas fueron realizadas en el programa de SigmaPlot® y la parte estadística fue realizada con la paquetería de SigmaStat® y Matlab®.

14. RESULTADOS

Todos los grupos experimentales contaron con un total de 11 ratas, incluidos los grupos que desplegaron cópula (CR5s, CR10s y CNR10s). Todos los registros conductuales fueron realizados de manera regular a las 15 horas del día, momento cercano al periodo de mayor actividad de las ratas en un ciclo de luz invertida. Los resultados conductuales se pueden dividir en aquellos análisis asociados al desempeño de los machos, como el número de eventos copulatorios: montas, intromisiones y eyaculaciones, y latencias de ejecución de la primera monta, intromisión, latencia de eyaculación. Mientras que los análisis conductuales cómo, el intervalo inter-intromisión (III), el coeficiente de lordosis (CFL), la latencia de regreso después de monta (LRM), la latencia de regreso de intromisión (LRI), y los porcentajes de salida después de una monta (%SDM) o una intromisión (%SDI), así como la latencia de regreso después de una eyaculación (LRE) y por último, el porcentaje de salida después de la eyaculación (%SDE), están relacionados con el desempeño de la rata hembra, en las modalidades de cópula regulada (CR5s y CR10s) y CNR. En primera instancia describiremos los resultados de conducta sexual y posteriormente los de inmunohistoquímica (revelado con DAB y por fluorescencia)

14.1 DESPLIEGUE DE LA CONDUCTA SEXUAL EN EL GRUPO DE CÓPULA REGULADA 5 SESIONES

Los animales que formaron parte del grupo de CR5s, contaron con un total de 5 sesiones de cópula, distribuidas tal como se puede observar en la Tabla 2. La última sesión de conducta se realizó 90 minutos antes del sacrificio, en el día 45. Cabe recordar que todas las ratas hembras establecieron contactos copulatorios siempre con el mismo macho. El análisis estadístico nos indicó que existen diferencias significativas entre sesiones, específicamente en las variables conductuales como el número de montas (K-W: $H(4)=18.934$, $p=0.001$) y en la latencia de intromisión (K-W: $H(4)=13.115$, $p=0.01$) (Tabla 2). Con respecto al número de montas, las hembras recibieron menos montas en la primera sesión en comparación de las sesiones 2 ($Q=3.369$) y 3 ($Q= 2.819$ valor de Dunn). En la sesión 2 las hembras recibieron mayor número de montas que en la última sesión, 5ta ($Q=3.036$). Mientras que la latencia de intromisión (LI) solo presentó diferencias en la primera sesión en comparación con la cuarta

($Q=2.997$), indicando un menor tiempo en la cuarta sesión. Variables como número de intromisiones (K-W: $H(4)=8.735$, $p=0.53$), número de eyaculaciones (K-W: $H(4)=5.061$, $p=0.281$), así como las latencias de ejecución de montas y eyaculación no presentaron diferencias significativas (LM, K-W: $H(4)=8.723$, $p=0.52$; K-W: LE, $H(4) = 5.48$, $p=0.24$). En cuanto al desempeño de las ratas hembras en las variables de intervalo inter intromisión (K-W: $H(4)=3.289$, $p=0.261$), intensidad media de lordosis (K-W: $H(4)=3.289$, $p=0.511$) y coeficiente de lordosis (K-W: $H(4)=6.79$, $p=0.53$), tampoco indicaron diferencias estadísticamente significativas, por lo que se puede corroborar que son una serie de respuestas estereotipadas y no a una conducta relacionada con la experiencia. Las conductas desplegadas por la rata hembra ligadas al paradigma de cópula regulada, como los son las latencias de regreso (LRM, K-W: $H(4)=9.723$, $p=0.054$; LRI K-W: $H(4)=5.937$, $p=0.204$; LRE, K-W: $H(4)=5.978$, $p=0.201$) y los porcentajes de salida después de un evento (SDM, K-W: $H(4)=6.512$, $p=0.164$; SDI, K-W: $H(4)=2.094$, $p=0.718$), tampoco presentaron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 2.- Resultados conductuales del grupo de cópula regulada 5 sesiones (CR5s). Las primeras 4 sesiones de conducta se establecieron con un intervalo de 5 días, mientras que la última se realizó 90 minutos previos al sacrificio. Los datos se expresan como promedio \pm EE.

Número de sesiones conductuales del grupo CR5

	1	2	3	4	5
# Montas	17.2 ± 3.1	48.4 ± 5.3 ^{1,5}	39.6 ± 4.5 ¹	37.6 ± 4.9	
# Intro.	21.0 ± 2.5	30.1 ± 3.5	26.6 ± 2.6	27.4 ± 2.9	
# Eyac.	2.3 ± 1.2	3.0 ± 1.0	2.8 ± 1.2	3.1 ± 1.1	
LM	318.1 ± 18.4	57.2 ± 7.1	77.4 ± 8.9	105.6 ± 8.6	
LI	404.1 ± 17.9	147.1 ± 14.4	123.7 ± 11.0	97.4 ± 10.9¹	
LE	1526.4 ± 28.9	958.8 ± 19.4	1161.4 ± 25.4	1116.4 ± 25.3	
III	109.2 ± 7.0	73.5 ± 4.1	78.7 ± 5.1	89.6 ± 7.7	
IML	1.9 ± 0.2	1.9 ± 0.3	1.9 ± 0.2	1.9 ± 0.2	
CL	99.2 ± 1.2	98.6 ± 1.4	99.2 ± 1.0	99.4 ± 0.9	
LRM	17.2 ± 3.3	13.3 ± 2.4	14.1 ± 2.5	15.9 ± 2.3	
LRI	69.9 ± 5.1	45.3 ± 4.6	52.4 ± 5.5	51.1 ± 5.8	
LRE	135.7 ± 10.2	158.2 ± 11.1	142.1 ± 10.1	220.9 ± 11.4	
%SDM	52.5 ± 4.8	34.1 ± 4.0	36.3 ± 4.5	51.9 ± 4.0	
%SDI	68.8 ± 4.5	60.5 ± 4.8	66.1 ± 5.9	70.3 ± 3.5	
%SDE	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	
	6	7	8	9	10
# Montas					17.6 ± 2.4
# Intro.					19.0 ± 2.9
# Eyac.					2.0 ± 1.1
LM					381.7 ± 22.2
LI					594.4 ± 32.7
LE					1754.3 ± 31.4
III					112.4 ± 6.9
IML					1.9 ± 0.2
CL					100.0 ± 0.0
LRM					29.4 ± 4.7
LRI					61.6 ± 6.3
LRE					207.8 ± 13.2
%SDM					40.6 ± 5.4
%SDI					65.6 ± 5.2
%SDE					100.0 ± 0.0

Los supra índices indican que son diferentes de la sesión indicada $p < 0.05$)

14.2. PARAMETROS DE LA CONDUCTA SEXUAL DEL GRUPO DE CÓPULA REGULADA 10 SESIONES

El grupo de cópula regulada consistió en 11 ratas a las cuales se les proporcionó un total de 10 sesiones de cópula regulada (CR10s) por la rata hembra. La frecuencia de cada sesión de cópula se estableció cada 5 días de manera rigurosa, a partir de la primera sesión hasta el día del sacrificio, concluidos los 45 días (Tabla 3). Es importante mencionar que al igual que el grupo de CR5s, las ratas del grupo de CR10s establecieron contactos copulatorios en cada sesión de conducta con el mismo macho. El análisis estadístico nos indicó que variables conductuales como el III (K-W: $H(9)=18.019$, $p=0.035$) y el %SDM (K-W: $H(9)=3.289$, $p=0.003$), presentaron diferencias significativas entre sesiones (Tabla 3). En el caso del III encontramos diferencias significativas entre la sesión 1 con respecto a las sesiones 4 ($Q=3.761$) y 5 ($Q=3.346$). Por su parte en el %SDM también encontramos diferencias entre sesiones, siendo estadísticamente diferente la sesión 9 con respecto a la sesión 3 ($Q=3.761$) y 2 ($Q=3.363$). Con respecto al resto de las conductas desplegadas tanto para el macho como para la hembra, no encontramos ninguna diferencia a través de las sesiones de cópula. En el caso del número de montas (K-W: $H(9)=12.98$, $p=0.163$), intromisiones (K-W: $H(9)=15.098$, $p=0.088$) y eyaculaciones (K-W: $H(9)=7.391$, $p=0.596$), como tampoco en los valores de las latencias de regreso después de una monta, intromisión y eyaculación (LRM, K-W: $H(9)=6.483$, $p=0.546$; LRI, K-W: $H(9)=11.589$, $p=0.237$; LRE, K-W: $H(4)=5.929$, $p=0.747$). En los parámetros más relacionados con el receptividad de la hembra como lo es la IML y el CL, tampoco encontramos cambio alguno (IML, K-W: $H(9)=9.471$, $p=0.395$; CL, K-W: $H(9)=10.880$, $p=0.284$).

Tabla 3.- Resultados conductuales del grupo de cópula regulada 10 sesiones (CR10S). Se encontraron diferencias significativas en las variables III y %SDM, en distintas sesiones de conducta. Los datos se expresan como promedio \pm EE.

Número de sesiones conductuales del grupo CR10

	1	2	3	4	5
# Montas	23.8 ± 3.5	44.8 ± 5.3	35.5 ± 5.1	34.6 ± 5.4	37.4 ± 4.1
# Intro.	21.7 ± 2.4	27.6 ± 3.0	27.6 ± 3.3	31.9 ± 3.6	32.9 ± 2.8
# Eyac.	2.3 ± 0.9	3.4 ± 1.2	2.7 ± 1.0	3.4 ± 0.9	3.3 ± 1.2
LM	161.8 ± 9.9	70.3 ± 7.9	146.5 ± 10.1	117.2 ± 9.8	122.7 ± 9.2
LI	256.6 ± 12.6	114.3 ± 10.8	275.5 ± 16.7	136.0 ± 10.7	145.5 ± 10.7
LE	1376.2 ± 24.0	977.5 ± 21.6	1361.5 ± 27.6	954.9 ± 16.7	971.0 ± 22.1
III	113.3 ± 5.1	79.4 ± 5.8	87.3 ± 6.2	61.7 ± 4.2¹	68.9 ± 5.6¹
IML	1.9 ± 0.3	1.9 ± 0.3	1.8 ± 0.4	1.8 ± 0.3	1.8 ± 0.4
CL	99.5 ± 1.1	98.5 ± 1.2	96.4 ± 2.0	95.2 ± 2.0	96.0 ± 2.1
LRM	17.2 ± 2.7	13.9 ± 2.5	13.1 ± 2.2	11.8 ± 2.1	12.0 ± 2.6
LRI	53.7 ± 4.4	39.8 ± 4.2	45.4 ± 4.2	44.4 ± 3.5	41.0 ± 3.6
LRE	139.0 ± 8.1	136.4 ± 7.9	165.6 ± 7.2	174.4 ± 8.1	176.7 ± 7.6
%SDM	46.7 ± 4.4	61.7 ± 4.2⁹	65.2 ± 4.1⁹	56.1 ± 4.9	51.0 ± 4.8
%SDI	61.1 ± 4.6	79.2 ± 3.5	83.5 ± 3.8	81.6 ± 3.4	84.5 ± 3.6
%SDE	100.0 ± 0	100.0 ± 0	100 ± 0	100.0 ± 0	98.0 ± 1.8
	6	7	8	9	10
# Montas	32.0 ± 4.2	18.1 ± 2.7	32.5 ± 4.2	33.9 ± 5.0	24.5 ± 4.1
# Intro.	28.4 ± 2.1	28.3 ± 2.0	26.7 ± 3.1	29.7 ± 2.0	30.5 ± 2.7
# Eyac.	2.8 ± 1.0	2.8 ± 1.2	2.7 ± 1.2	2.7 ± 1.2	3.1 ± 0.8
LM	119.3 ± 7.6	178.1 ± 12.4	114.6 ± 9.6	112.6 ± 8.1	160.0 ± 11.6
LI	163.0 ± 8.6	228.4 ± 13.3	140.3 ± 10.1	210.3 ± 13.6	143.5 ± 12.1
LE	1160.2 ± 23.5	1104.3 ± 25.6	1539.0 ± 30.4	1246.1 ± 25.5	1052.7 ± 19.2
III	73.9 ± 4.9	71.9 ± 4.5	89.8 ± 6.5	74.2 ± 5.0	67.1 ± 3.9
IML	1.9 ± 0.4	1.9 ± 0.4	1.8 ± 0.5	1.8 ± 0.4	1.9 ± 0.4
CFL	97.3 ± 2.0	96.9 ± 2.2	95.6 ± 2.8	96.3 ± 2.4	96.1 ± 2.4
LRM	11.4 ± 2.3	22.5 ± 4.8	14.3 ± 3.1	11.9 ± 2.2	15.0 ± 2.8
LRI	43.7 ± 3.3	45.9 ± 4.0	51.3 ± 4.8	52.4 ± 4.6	51.0 ± 3.9
LRE	193.5 ± 9.7	214.2 ± 12.0	200.8 ± 9.7	199.8 ± 8.5	186.9 ± 7.2
%SDM	46.0 ± 3.5	46.8 ± 4.8	36.6 ± 4.3	32.7 ± 4.5	39.7 ± 4.5
%SDI	81.9 ± 3.1	77.0 ± 3.9	86.7 ± 3.4	84.0 ± 3.2	84.7 ± 3.5
%SDE	100.0 ± 0	93.2 ± 2.6	100.0 ± 0	100.0 ± 0	100.0 ± 0

Los supra índices indican que son diferente de la sesión indicada $p < 0.05$

14.3 PARÁMETROS DE LA CONDUCTA SEXUAL DEL GRUPO DE CÓPULA NO REGULADA 10 SESIONES

El grupo de cópula no regulada por la hembra en 10 sesiones (CNR10s) también contó con un total de 11 ratas, que copularon en cada sesión con el mismo macho. Como es de suponer el paradigma de cópula no regulada carece de variables asociadas al retorno del compartimento de la hembra, como los son las variables de latencias de regreso (después de una monta, intromisión y eyaculación), así como los porcentajes de salida (después de una monta, intromisión y eyaculación). Se compararon todas las sesiones de conducta, con el objetivo de determinar si existían cambios significativas entre las 10 sesiones de conducta. Reflejando diferencias significativas entre sesiones en las variables de IML (K-W: $H(9)=17.806$, $p=0.037$) y CL (K-W: $H(9)=22.053$, $p=0.009$), ambas entre la primera y cuarta sesión de cópula ($Q=3.427$) y ($Q=3.584$) respectivamente (Tabla 4). Los parámetros conductuales asociados al macho como el número de montas, intromisiones y eyaculaciones no presentaron cambios significativos (#Montas, K-W: $H(9)=9.105$, $p=0.4$; #Intros, K-W: $H(9)=9.176$, $p=0.421$; #Intros, K-W: $H(9)=3.333$, $p=0.950$). Mientras que las latencias de monta, intromisión y eyaculación no presentaron cambios significativos.

Tabla 4.- Resultados conductuales del grupo de cópula NO regulada 10 sesiones (CNR10S). Se encontraron diferencias significativas en las variables III, IML exclusivamente entre la sesión 1 y 4. Los datos se expresan como promedio \pm EE.

Número de sesiones conductuales del grupo CNR10

	1	2	3	4	5
# Montas	53.5 ± 4.8	55.9 ± 6.0	58.5 ± 6.0	50.4 ± 6.1	64.3 ± 6.2
# Intro.	36.8 ± 3.5	33.9 ± 3.6	30.5 ± 3.7	43.1 ± 3.1	34.2 ± 3.6
# Eyac.	3.8 ± 1.3	3.9 ± 1.4	3.7 ± 1.2	4.3 ± 1.1	3.6 ± 1.0
LM	192.2 ± 13.3	75.4 ± 7.6	245.3 ± 21.6	101.0 ± 12.4	100.0 ± 12.1
LI	262.7 ± 13.5	150.0 ± 13.0	190.5 ± 17.3	132.5 ± 12.7	75.4 ± 8.8
LE	1123.2 ± 30.4	1008.2 ± 29.5	941.9 ± 22.6	730.5 ± 24.5	736.2 ± 21.2
III	57.8 ± 6.3	74.2 ± 8.1	54.4 ± 5.4	38.0 ± 4.7	57.5 ± 5.1
IML	2.0 ± 0.2⁴	2.0 ± 0.2	2.0 ± 0.2	1.9 ± 0.3	1.9 ± 0.3
CL	99.9 ± 0.4⁴	98.5 ± 1.6	99.4 ± 1.0	96.4 ± 1.8	96.8 ± 2.2
	6	7	8	9	10
# Montas	31.1 ± 3.9	46.0 ± 6.2	38.0 ± 5.4	24.7 ± 3.3	33.2 ± 4.7
# Intro.	45.4 ± 5.6	35.1 ± 2.3	36.4 ± 3.3	34.5 ± 3.2	36.8 ± 2.7
# Eyac.	4.0 ± 1.0	3.6 ± 1.1	4.1 ± 1.0	3.9 ± 1.2	3.8 ± 1.0
LM	73.2 ± 8.1	79.5 ± 8.3	98.0 ± 11.1	85.0 ± 8.6	102.4 ± 9.9
LI	129.4 ± 10.5	122.0 ± 8.1	91.1 ± 10.3	144.9 ± 10.5	106.5 ± 10.5
LE	792.4 ± 19.1	870.5 ± 21.2	612.5 ± 13.0	948.6 ± 29.4	1099.0 ± 28.0
III	35.9 ± 2.8	49.8 ± 3.6	76.9 ± 9.9	58.1 ± 6.6	61.5 ± 7.2
IML	1.9 ± 0.4	1.9 ± 0.4	1.9 ± 0.4	1.9 ± 0.4	1.9 ± 0.4
CL	96.2 ± 2.4	98.3 ± 2.0	97.1 ± 2.0	97.6 ± 1.9	97.6 ± 2.3

Los supra índices indican que son diferente de la sesión indicada $p < 0.05$

11.4. COMPARACIÓN ESTADÍSTICA ENTRE LOS TRES GRUPOS DE CÓPULA

Por último, se evaluaron posibles cambios conductuales entre los tres grupos de cópula (CR5s, CR10s y CNR10s), para cada una de las variables, por lo que realizamos un promedio de las sesiones de conducta sexual por rata y para cada variable conductual. Encontrando diferencias significativas entre el grupo CNR10s en comparación con los de cópula regulada (CR5s y CR10s), éstas diferencias conductuales se encontraron en las siguientes variables: número de intromisiones (K-W: $H(2) = 7.282$, $p = 0.026$), entre los grupos de CNR10s vs CR5s ($Q = 2.192$) y CNR10s vs CR10s ($Q = 2.379$), así como en el III (K-W: $H(2) = 7.045$, $p = 0.030$) entre el grupo de CNR10s vs CR5s y CR10s ($Q = 2.332$ y $Q = 2.429$ respectivamente, Tabla 5). Mientras que el análisis estadístico no indicó una diferencia significativa entre grupos, en los parámetros de IML (K-W: $H(2) = 3.103$, $p = 0.212$) y el CL (K-W: $H(2) = 4.228$, $p = 0.121$), lo que sugiere que las ratas hembra desplegaron los mismos niveles de proceptividad y receptividad.

Por otra parte, no hubo diferencias significativas entre las variables conductuales asociadas al paradigma de cópula regulada como lo son las latencias de regreso (después de una monta, intromisión, eyaculación), así como los porcentajes de salida después de los mismos entre los grupos de cópula regulada de CR10s y CR5s.

Tabla 5.- Comparación conductual entre los tres grupos de cópula. En esta tabla se puede observar el despliegue de los patrones conductuales en los tres grupos de hembras. Datos expresados como.

Comparación Conductual entre grupos de Cópula			
Mediciones conductuales	Grupos		
Numero	CR5s	CR10s	CNR10s
# Montas	31.88 ± 3.33	31.56 ± 3.39	46.21 ± 4.92
# Intro.	24.96 ± 2.18	28.66 ± 2.29	36.66 ± 2.93 *
# Eyac.	2.67 ± 1.02	2.84 ± 0.98	3.83 ± 1.01 *
Latencias (seg)			
Monta	176.57 ± 11.40	130.48 ± 8.03	115.09 ± 10.24
intromisión	256.31 ± 15.54	181.52 ± 9.34	140.68 ± 9.27
Eyaculación	1295.00 ± 22.16	1214.34 ± 19.71	907.09 ± 21.53
III (seg)	92.76 ± 5.31	79.71 ± 4.16	57.19 ± 4.75 *
IML	1.92 ± 0.16	1.85 ± 0.31	1.91 ± 0.27
CFL	99.23 ± 0.78	96.70 ± 1.76	97.77 ± 1.61
Latencias de regreso después de (seg)			
Monta	17.29 ± 2.58	14.29 ± 2.02	
Intromisión	55.10 ± 3.84	46.79 ± 3.08	
Eyaculación	172.11 ± 9.08	179.30 ± 6.61	
Porcentaje de salidas después de			
Monta	44.06 ± 3.47	48.35 ± 3.09	
Intromisión	66.52 ± 3.58	80.38 ± 2.11	
Eyaculación	100.00 ± 0.00	99.57 ± 1.79	
*Diferente de ambos grupos de copula regulada $p < 0.05$.			

14.5 LA CUANTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS INMUNORREACTIVAS A BRDU

Para identificar a aquellas células que incorporaron el marcador mitótico de BrdU en la primera sesión de conducta, se utilizó la técnica de inmunohistoquímica contra BrdU. Abarcando los tres AOIs (400 m² c/u) respectivos para cada capa (glomerular, mitral y granular) en el caso del BOP, y los 6 AOIs (200 m² c/u) en cada capa del BOA, manteniendo la división entre anterior y posterior (Fig. 10). De esta manera los resultados cuantitativos son representados en número de células por mm².

14.5.1 LA CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS INMUNORREACTIVAS A BRDU EN EL BULBO OLFATORIO PRINCIPAL

Se realizó el promedio de las células cuantificadas de 7 ratas por grupo. La cuantificación celular por capas indicó que en la capa glomerular de todos los grupos experimentales rondó en el rango de entre las 10 y 20 células por mm^2 , mientras que en la capa mitral y granular, el número de células osciló 25 a 80 células por mm^2 y 60 a 100 células por mm^2 respectivamente. Al realizar el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas entre grupos en las tres capas del BOP (Fig. 12).

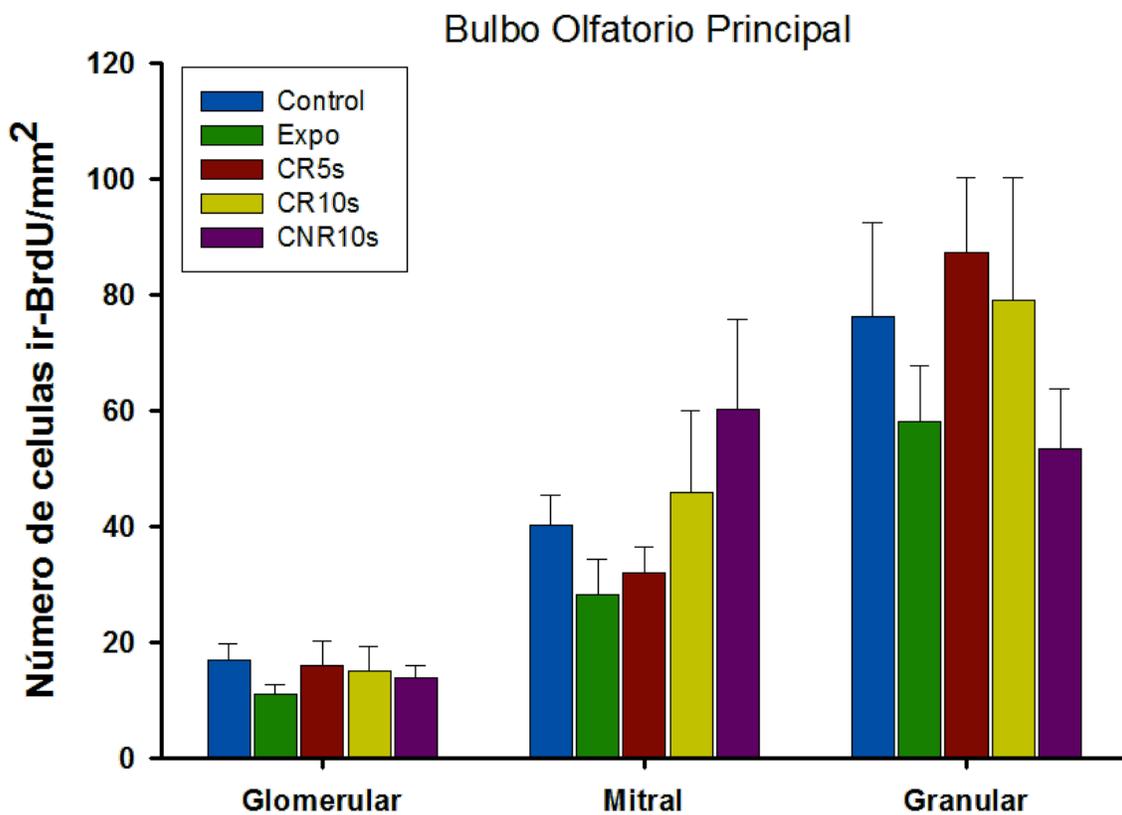


Figura 12.- Número de células BrdU positivas por mm^2 en las 3 capas del BOP, glomerular, mitral y granular. (promedio \pm EE)

14.5.2 LA CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS INMUNORREACTIVAS A BRDU EN EL BULBO OLFATORIO ACCESORIO

Anatómicamente y funcionalmente el BOA está dividido en anterior y posterior, sin embargo la comparación estadística realizada sobre el número de células entre grupos por porción (anterior y posterior), no indicó diferencia significativa alguna, por esta razón se decidió agrupar el número de células encontradas en la porción anterior y posterior. El número de células en las capas del bulbo olfatorio (GL, M y Gr), en todos los grupos experimentales se mantuvo relativamente constante entre las 15 a 25 células por mm², con excepción en el grupo de CR10s para la capa glomerular que tuvo el mayor número de células en comparación al grupo control (Fig. 13). Siendo esta diferencia estadísticamente significativa (U=140; p=0.04).

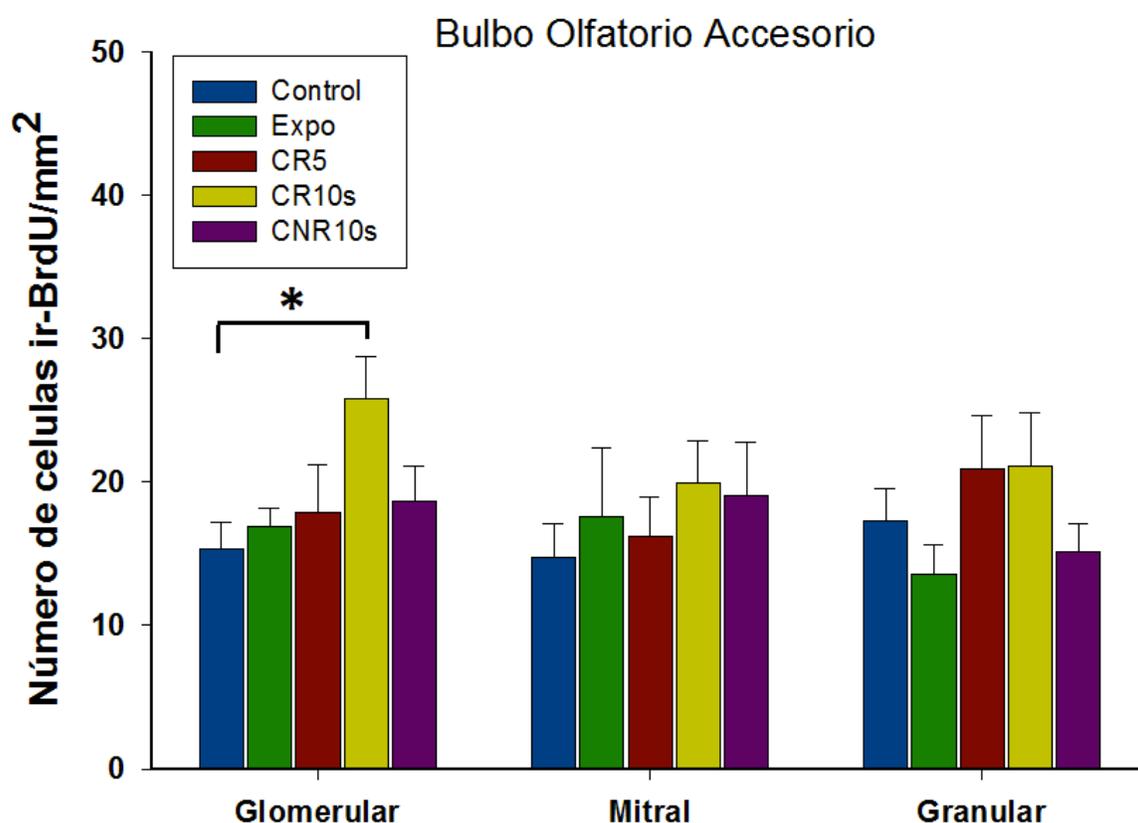


Figura 13.- El análisis cuantitativo de las células inmunorreactivas a BrdU en el bulbo olfatorio accesorio (BOA). Se muestran el número de células BrdU positivas por mm² en las 3 capas del BOA, glomerular, mitral y granular. (promedio ± EE).

* Diferente del grupo control p<0.05.

14.6 LA CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS BRDU/NEUN POSITIVAS

Se realizó la inmunofluorescencia previamente descrita para los tres marcadores BrdU, NeuN y c-fos, en los grupos de CR10s y CNR10s, así como para el grupo control. Al evaluar los tejidos obtenidos con el triple marcaje se notó que la marca de c-fos no fue adecuada para llevar a cabo una correcta cuantificación debido a que la relación señal/ruido de fondo era cercana a 1 en más del 50% de las muestras, optando por analizar únicamente la marca de BrdU y NeuN. La cuantificación de las células doblemente marcadas consistió en identificar inicialmente a aquellas células BrdU positivas (color verde) ubicadas en los AOIs, previamente descritos en el BOP y BOA (Fig. 11), considerándose de esta forma el 100% de células nuevas para cada una de las regiones anatómicas (Fig. 14), una vez localizadas posteriormente se identificó a aquellas células positivas de igual manera para el marcador de NeuN (color rojo). Se obtuvo el promedio de las células cuantificadas en un total de 4 rebanadas por animal, incluyendo para cada grupo experimental de un total de 5 animales experimentales.

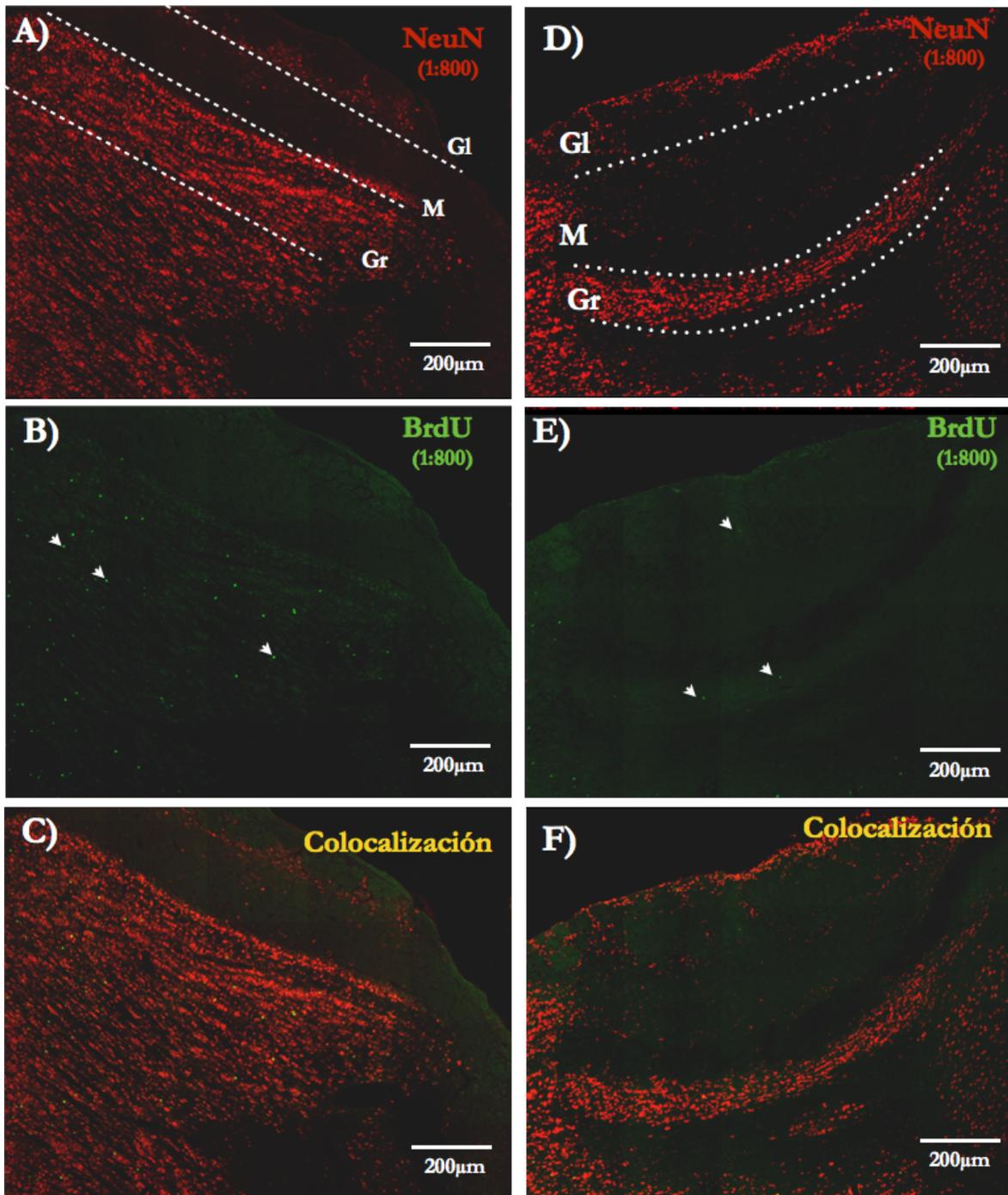


Figura 14.- Inmunofluorescencia para BrdU y NeuN en el bulbo olfatorio principal y accesorio. A) Detección del marcador neuronal NeuN (rojo); B) Localización del marcador mitótico BrdU (verde); C) Colocalización de ambos marcadores BrdU/NeuN BOP (tonalidad amarilla); D) Imagen representativa del marcador NeuN (rojo); E) Marcador de división celular BrdU en verde; F) colocalización de la marca BrdU/NeuN en el BOA. **GI**, capa glomerular; **M**, capa mitral y **Gr**, capa granular.

A continuación se activaron los canales correspondientes a ambos marcadores (colocalización o merge), y se confirmó mediante la herramienta de corte ortogonal, la colocalización en las tres proyecciones ópticas manteniendo una nube de tonalidad amarilla en cada una de ellas (Fig. 15). De esta forma nuestros resultados son reportados como porcentaje de células doblemente marcadas con respecto al 100% de células BrdU totales, para cada una de las tres condiciones experimentales.

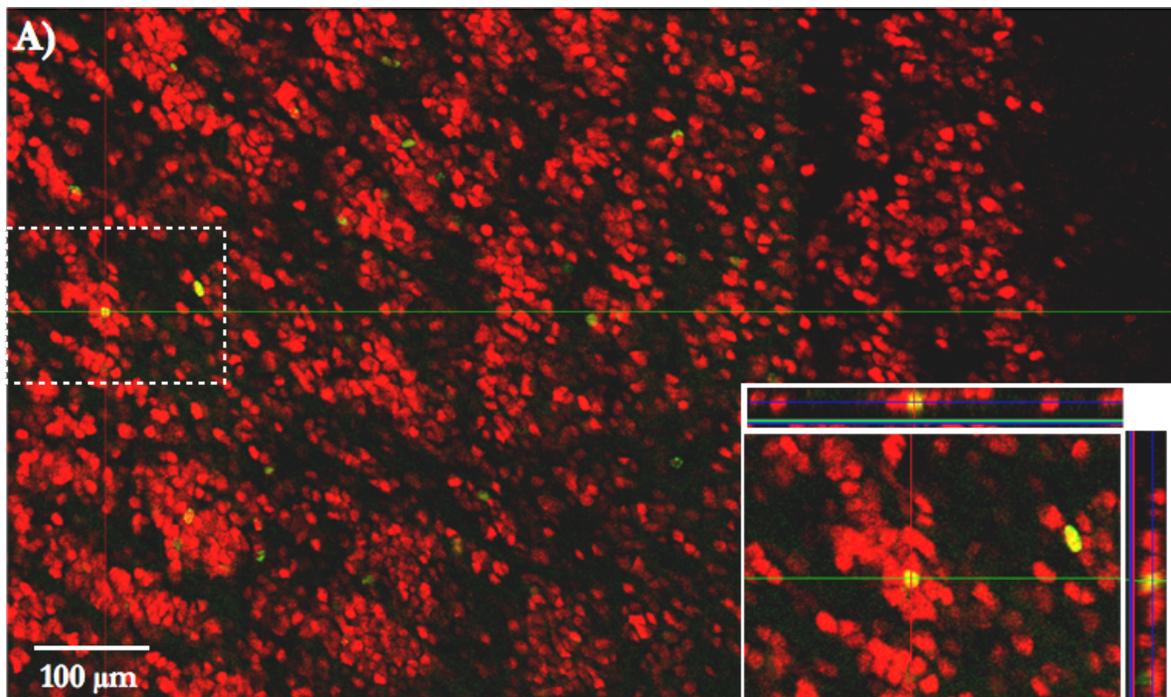


Figura 15.- Vista ortogonal de una célula doblemente marcada para BrdU/NeuN. Note en el inserto la colocalización de ambos marcadores en la nube de tonalidad amarilla en las tres proyecciones visuales.

Para la determinación de posibles diferencias en la diferenciación celular hacia neuronas, a partir de las células BrdU positivas originadas en la primera sesión de cópula, se realizó un promedio del porcentaje de células doblemente marcadas BrdU/NeuN, para el grupo control, CR10s y CNR10s (Tabla 6). Posteriormente se realizó una prueba de χ^2 , comparando así cada grupo experimental con respecto al control, lo cual nos determinó una diferencia significativa únicamente entre el grupo control y el grupo de CR10s. Interesantemente el análisis en la capa glomerular del BOA no mostró diferencias significativas entre el grupo control y el grupo de CR10s (χ^2 : Tcal(1)= 0.0043, $p > 0.05$), cuyos resultados de inmunohistoquímica con DAB,

indicaron un incremento significativo entre los mismos grupos, esto podría indicar que el incremento celular está tomando otro rumbo de diferenciación celular y no así a neuronas. En el caso de la capa mitral y granular del BOA del grupo de CR10s, no encontramos diferencias en el número de células doblemente marcadas (X^2 : Tcal (1)= 0.0047, $p>0.05$; X^2 : Tcal (1)= 0.1243, $p>0.05$) respectivamente. La única diferencia significativa como podemos observar en la Tabla 6, se observó en la capa granular del BOP entre los grupos control vs CR10s (X^2 : Tcal (1)= 4.4817, $*p<0.025$). Tampoco encontramos diferencias significativas entre el grupo control vs el grupo de CNR10s (X^2 : Tcal= 0.7224, $p>0.05$). En el resto de las capas del BOP, tampoco encontramos diferencias significativas en la capa glomerular (X^2 : Tcal (1)= 0.0123, $p>0.05$) y mitral (X^2 : Tcal (1)= 0.0128, $p>0.05$)

Por su parte la comparación realizada entre el grupo control vs CNR10s no indicó ninguna diferencia significativa ya sea por capas del BOA o BOP, en todos los casos los valores obtenidos en el porcentaje de células doblemente marcadas se mantuvo en el mismo rango que el control. La comparación entre el grupo CR10s y CNR10s no arrojó diferencias significativas (datos no incluidos).

Porcentaje de células doblemente marcadas BrdU/NeuN

	Capa	Control	CR10s	CNR10s
BOA	GL	35.57 ± 11.51	37.65 ± 4.66	36.95 ± 6.49
	M	20.88 ± 11.47	19.61 ± 7.58	18.96 ± 9.65
	Gr	32.81 ± 10.89	35.41 ± 4.32	34.64 ± 10.84
BOP	GL	29.81 ± 9.53	39.57 ± 14.15	34.36 ± 23.77
	M	60.47 ± 12.94	63.55 ± 14.10	65.38 ± 7.60
	Gr	41.65 ± 6.87	72.67 ± 4.64*	60.23 ± 5.50

Tabla 6.- Porcentaje de células doblemente marcadas para BrdU/NeuN por capas anatómicas en el BOA y BOP, en los grupos control, cópula regulada y no regulada durante 10 sesiones. (media ± EE. *Diferente del grupo control $p<0.05$).

15. DISCUSIÓN

La neurogénesis es un proceso fisiológico complejo que involucra diversos mecanismos celulares, así como hormonas y factores tróficos que facilitan la proliferación celular de los nichos neurogénicos del cerebro del adulto. Como se ha mencionado anteriormente la neurogénesis es modulada por diversos paradigmas, entre ellos la cópula regulada (Corona et al., 2011). Así mismo el número de sesiones de CR es capaz de potenciar el número de células nuevas que llegan al BO en las capas: mitral y granular tanto del BOP como del BOA, a los 16 días posteriores a la primera sesión de cópula (Arzate et al., 2013). Sin embargo, las células originadas en las condiciones antes mencionadas no son capaces de sobrevivir al día 45 (Corona et al., 2016). La hipótesis planteada en el presente trabajo sugería que era necesaria la constante estimulación sensorial (CR10s) para facilitar la supervivencia de las células hasta el día 45. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo difieren a los reportados a los 16 días en el grupo CR4s.

Los resultados obtenidos indicaron un incremento en el número de células nuevas (BrdU IR-positivas) en la capa glomerular del BOA, únicamente en el grupo experimental de CR10s con respecto al control y no así en las capas granular o mitral (Arzate et al., 2013). Una posible explicación a esto, recae en el tiempo concedido a las células para su migración e incorporación, ya que según la literatura entre los días 15 y 22 posteriores a su surgimiento, es posible localizarlas primordialmente en la capa granular y/o mitral (Ming and Song, 2011; Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002), lo cual coincide con lo reportado en los experimentos de cópula regulada 4 sesiones (16 días), sin embargo es factible que estas células puedan requerir un tiempo más prolongado para poder alcanzar la capa glomerular si esta fuera su destino final, situación que se aproximaría a nuestros hallazgos a los 45 días (CR10s).

Al evaluar las células de este grupo experimental, mediante microscopía confocal no encontramos un cambio en la proporción de células doblemente marcadas (BrdU/NeuN), en comparación con el grupo control, pudiendo sugerir que estas células tomaron otro compromiso celular posiblemente de origen glial. Existen reportes que las células astrocíticas en la capa glomerular del BOP cumplen un papel homeostático en la transmisión sináptica entre las células periglomerulares y las células de proyección (Martin et al., 2012), siendo cruciales para el adecuado procesamiento de olores comunes. Por su parte en el BOA pueden actuar como moduladores en la entrada de información proveniente de la experiencia sexual,

mediante la activación de glomérulos específicos en el BOA, lo que le provee al animal de información acerca de sus congéneres y su estado reproductivo (Coria-Avila et al., 2005).

En el caso del BOP no encontramos diferencias significativas en el número de células BrdU IR-positivas en ninguno de los grupos experimentales, al llevar a cabo la microscopía confocal encontramos una diferencia en la proporción de células doblemente marcadas entre el grupo de CR10s y el grupo control, en la capa granular. Se ha demostrado que las células granulares son cruciales para el procesamiento y discriminación de patrones olfatorios (McTavish et al., 2012).

Además, de la información sensorial que modula la proliferación, migración y diferenciación de las células de la ZSV al BOA existen otros factores que influyen en la supervivencia celular asociada a la neurogénesis en el BO. Uno de ellos es el sistema opioide, cuyos agonistas inducen proliferación y diferenciación celular en la ZSG del hipocampo (Persson et al., 2003), misma que puede ser abatida por la administración de antagonistas como la naloxona, naltrindole, naltrexona (Zhang et al., 2016). Esta evidencia farmacológica sugiere que la activación de receptores opioide presentes en las células troncales neuronales (NSPCs, por sus siglas en inglés), pueden inducir su división de manera aguda. Sin embargo, al prolongar el tiempo de administración del agonista opioide terminan por agotar la disponibilidad de las NPSCs disponibles para iniciar la división celular (Zhang et al., 2016). Otros grupos han sugerido que el sistema opioide en vez de actuar directamente sobre las NPSC, puede incidir en la producción directa de EGF y VEGF, y estas a su vez sobre las NPSCs o bien sobre las células en migración, provocando el mismo efecto antes descrito (Arguello et al., 2009).

Otros posibles candidatos que modulan la proliferación, migración y diferenciación de las células de la ZSV al BOA son los factores de crecimiento. En un trabajo realizado por Ochi y cols. (2016), evaluaron el efecto de la administración intraventricular de manera bilateral de factores de crecimiento: el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF2, Fibroblast growth factor 2) y el factor de crecimiento endotelial (EGF, Endothelial growth factor), debido a que ya se había demostrado previamente que una administración aguda de este mismo coctel produce un incremento en la neurogénesis (Oya et al., 2008), sus resultados coinciden con lo reportado en el hipocampo, es decir una disminución en la neurogénesis pero ahora en la ZSV y las células reclutadas en el BO. Estos resultados demuestran la importancia de una

administración a través del tiempo y no únicamente, de la concentración de los promotores de la neurogénesis (Ochi et al., 2016).

Existe una relación entre la neurogénesis de la ZSV, el sistema opioide, los factores FGF y EGF, en nuestro paradigma experimental. Se ha demostrado que la CR induce un estado afectivo positivo o “placentero”, evaluado mediante la tarea de Preferencia de Lugar Condicionado (PLC) (Paredes and Alonso, 1997). El efecto reportado en la PLC se sustenta en que el paradigma de cópula regulada promueve una estimulación sexual diferente hacia la hembra, debido a la existencia de una barrera que obstruye el libre paso de la rata macho. Algunos eventos copulatorios se ven disminuidos en comparación a la CNR, como el número de montas, el número de intromisiones y de eyaculaciones, estos dos últimos, revalidados con nuestros resultados comparativos entre los grupos de cópula regulada y no regulada. Mientras que el intervalo inter-intromisión (III) se ve incrementado en la CR, ya que en la CNR la hembra recibe más intromisiones en menos tiempo. Estos parámetros determinan en última instancia la cualidad de los estímulos recibidos por la hembra, induciendo así el cambio en la PLC. Cabe señalar que el cambio de preferencia de lugar, puede ser bloqueado por la administración del antagonista opioide naloxona tanto en machos (Agmo and Gomez, 1993) como en hembras (Martinez and Paredes, 2001).

De igual manera, la neurogénesis en el BO inducida por la CR se bloquea por la administración I.P. de naloxona previa a la primera sesión de cópula (Santoyo-Zedillo en prep.). Es posible que la estimulación sexual repetida promueva un estado similar a lo reportado por el grupo de Ochi (2016) en donde un número reducido de sesiones de CR, tendría un efecto potenciador de la neurogénesis igual que una administración aguda de FGF y EGF (Oya et al., 2008), mientras que un número mayor de sesiones de CR, produciría un efecto antagónico en la proliferación celular, similar al tratamiento crónico con el coctel de factores de crecimiento. Adicionalmente, se ha descrito que la activación del sistema opioide puede determinar el rumbo de la diferenciación celular de las células nuevas en el hipocampo, pudiendo alternar entre neuronas o glía (Persson et al., 2006).

Estos trabajos y nuestros resultados sugieren ampliamente que el efecto de los promotores de la neurogénesis de los nichos neuronales no solo dependen de la concentración, o en este caso particular del número de sesiones, sino que el efecto temporal juega un papel determinante

sobre el sistema, promoviendo una respuesta celular con una forma de U invertida, en dónde una ventana temporal de corta duración induce proliferación, y si se sobrepasa el periodo crítico (16 días) esto promoverá un efecto antagónico sobre el nicho neurogénico. Para comprobar dicha hipótesis se propone para futuros estudios realizar una segunda administración con otra molécula análoga de la timidina como la cloro-deoxiuridina (Cloro-dU) o bien yodo-deoxiuridina (Yodo-dU) en la 7ma sesión de la CR, con el objetivo de abarcar las últimas cuatro sesiones, esperando replicar lo realizado por Arzate (2013). Esto nos permitirá determinar, si efectivamente también la proliferación y migración de una segunda oleada de células se ve disminuida por una activación crónica del sistema opiodérgico.

16. CONCLUSIONES

La cópula regulada durante 10 sesiones en un intervalo de tiempo de 45 días, no induce una proliferación similar a lo reportado a las 4 sesiones de cópula, lo que sugiere que los estímulos sensoriales asociados a la cópula no son el principal promotor de la supervivencia de las células de la primera cópula.

El grupo experimental de cópula regulada 10 sesiones, mostró diferencias significativas en el número de células BrdU positivas en comparación al control, pero en esta ocasión en la capa glomerular del BOA, nunca antes descrita en relación a la cópula regulada.

Nuestros resultados obtenidos mediante microscopía confocal, indicaron que pueden existir otros tipos de cambios provocados por la cópula regulada, y no únicamente en el número de células nuevas, como en el caso del grado de diferenciación celular a neuronas. Ya que únicamente en la capa granular del BOP fue diferente la proporción de células BrdU/NeuN con respecto al control, y no así en la capa glomerular del BOA, que a pesar de haber más células BrdU positivas, la proporción de las células doblemente marcadas no resultó distinto al grupo control.

Por último consideramos necesario evaluar el destino de las células originadas en la 7ma sesión (abarcando las últimas 4 sesiones de un total de 10 sesiones), con otro marcador de división celular (TodoU, CloroU), permitiendo distinguirlas aquellas que fueron marcadas con BrdU, esto nos permitirá determinar si existe un proceso de reclutamiento celular por oleadas, indiferente al número de cópula, o bien una disminución en la proliferación y supervivencia provocada por el número de sesiones de cópulas recibidas previamente.

17. BIBLIOGRAFÍA

1. Agmo, A., and Gomez, M. (1993). Sexual reinforcement is blocked by infusion of naloxone into the medial preoptic area. *Behavioral neuroscience* 107, 812-818.
2. Allen, W.M. (1931). Cyclical alterations of the endometrium of the rat during the normal cycle, pseudopregnancy, and pregnancy II. Production of deciduomata during pregnancy. *Anat Rec* 48, 65-103.
3. Altman, J., and Das, G.D. (1965). Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature* 207, 953-956.
4. Alvarez-Buylla, A., and Garcia-Verdugo, J.M. (2002). Neurogenesis in adult subventricular zone. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 629-634.
5. Alvarez-Buylla, A., and Lois, C. (1995). Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrates. *Stem cells* 13, 263-272.
6. Arguello, A.A., Fischer, S.J., Schonborn, J.R., Markus, R.W., Brekken, R.A., and Eisch, A.J. (2009). Effect of chronic morphine on the dentate gyrus neurogenic microenvironment. *Neuroscience* 159, 1003-1010.
7. Arzate, D.M., Portillo, W., Corona, R., and 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, 151-160.
8. Berghard, A., Buck, L.B., and Liman, E.R. (1996). Evidence for distinct signaling mechanisms in two mammalian olfactory sense organs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 2365-2369.
9. Blake, C.A., and Sawyer, C.H. (1972). Effects of vaginal stimulation on hypothalamic multiple-unit activity and pituitary LH release in the rat. *Neuroendocrinology* 10, 358-370.
10. Blaustein, J.D.M., S.K. (2007). Feminine sexual behavior form neuroendocrine and molecular neurobiological perspectives. In *Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology* A.B. Lajtha, J.D. , ed. (Springer).
11. Boekhoff, I., Tareilus, E., Strotmann, J., and Breer, H. (1990). Rapid activation of alternative second messenger pathways in olfactory cilia from rats by different odorants. *The EMBO journal* 9, 2453-2458.

12. Bressler, S.C., and Baum, M.J. (1996). Sex comparison of neuronal Fos immunoreactivity in the rat vomeronasal projection circuit after chemosensory stimulation. *Neuroscience* 71, 1063-1072.
13. Buck, L.B. (1996). Information coding in the mammalian olfactory system. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 61, 147-155.
14. Coria-Avila, G.A., Ouimet, A.J., Pacheco, P., Manzo, J., and Pfau, J.G. (2005). Olfactory conditioned partner preference in the female rat. *Behavioral neuroscience* 119, 716-725.
15. Corona, R., Larriva-Sahd, J., and 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, e19380.
16. Corona, R., Retana-Marquez, S., Portillo, W., and 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. *Front Neurosci* 10, 48.
17. Dewsbury, D.A. (1979). Description of sexual behavior in research on hormone behavior interactions. In *Endocrine Control of Sexual Behavior*, C. Beyer, ed. (New York: Raven Press).
18. Diamond, M. (1970). Intromission pattern and species vaginal code in relation to induction of pseudopregnancy. *Science* 169, 995-997.
19. Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17, 5046-5061.
20. Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2002). EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 36, 1021-1034.
21. Dulac, C., and Wagner, S. (2006). Genetic analysis of brain circuits underlying pheromone signaling. *Annual review of genetics* 40, 449-467.
22. Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., and Gage, F.H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine* 4, 1313-1317.

23. Erskine, M.S. (1985). Effects of paced coital stimulation on estrus duration in intact cycling rats and ovariectomized and ovariectomized-adrenalectomized hormone-primed rats. *Behavioral neuroscience* 99, 151-161.
24. Erskine, M.S., and Baum, M.J. (1982). Effects of paced coital stimulation on termination of estrus and brain indoleamine levels in female rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 17, 857-861.
25. Erskine, M.S., and Hanrahan, S.B. (1997). Effects of paced mating on c-fos gene expression in the female rat brain. *Journal of neuroendocrinology* 9, 903-912.
26. Erskine, M.S., Lehmann, M.L., Cameron, N.M., and Polston, E.K. (2004). Co-regulation of female sexual behavior and pregnancy induction: an exploratory synthesis. *Behavioural brain research* 153, 295-315.
27. Guthrie, K.M., Anderson, A.J., Leon, M., and Gall, C. (1993). Odor-induced increases in c-fos mRNA expression reveal an anatomical "unit" for odor processing in olfactory bulb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 3329-3333.
28. Haberly, L.B., and Price, J.L. (1978). Association and commissural fiber systems of the olfactory cortex of the rat. *The Journal of comparative neurology* 178, 711-740.
29. Hardy, D.F., and DeBold, J.F. (1972). Effects of coital stimulation upon behavior of the female rat. *Journal of comparative and physiological psychology* 78, 400-408.
30. Hull, E., Wood, R., McKenna, K., (2006). *Neurobiology of male sexual behavior*. In *Physiology of Reproduction*, E.a.N. Knobil, K., ed. (San Diego: Academic Press), pp. 1729-1823.
31. Jacobson, L., Trotier, D., and Doving, K.B. (1998). Anatomical description of a new organ in the nose of domesticated animals by Ludvig Jacobson (1813). *Chemical senses* 23, 743-754.
32. Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X.O., Xie, L., and Greenberg, D.A. (2002). Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 11946-11950.
33. Krettek, J.E., and Price, J.L. (1977a). Projections from the amygdaloid complex and adjacent olfactory structures to the entorhinal cortex and to the subiculum in the rat and cat. *The Journal of comparative neurology* 172, 723-752.

34. Krettek, J.E., and Price, J.L. (1977b). Projections from the amygdaloid complex to the cerebral cortex and thalamus in the rat and cat. *The Journal of comparative neurology* 172, 687-722.
35. Larriva-Sahd, J. (2008). The accessory olfactory bulb in the adult rat: a cytological study of its cell types, neuropil, neuronal modules, and interactions with the main olfactory system. *The Journal of comparative neurology* 510, 309-350.
36. Laywell, E.D., Rakic, P., Kukekov, V.G., Holland, E.C., and Steindler, D.A. (2000). Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 13883-13888.
37. LeFevre, J., and McClintock, M.K. (1988). Reproductive senescence in female rats: a longitudinal study of individual differences in estrous cycles and behavior. *Biology of reproduction* 38, 780-789.
38. Li, C.S., Kaba, H., Saito, H., and Seto, K. (1990). Neural mechanisms underlying the action of primer pheromones in mice. *Neuroscience* 36, 773-778.
39. Li, L., and Xie, T. (2005). Stem cell niche: structure and function. *Annual review of cell and developmental biology* 21, 605-631.
40. Liman, E.R., and Corey, D.P. (1996). Electrophysiological characterization of chemosensory neurons from the mouse vomeronasal organ. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16, 4625-4637.
41. Liman, E.R., Corey, D.P., and Dulac, C. (1999). TRP2: a candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 5791-5796.
42. Lois, C., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1996). Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271, 978-981.
43. Magavi, S.S., and Macklis, J.D. (2002). Immunocytochemical analysis of neuronal differentiation. *Methods in molecular biology* 198, 291-297.
44. Mainland, J.D., Bremner, E.A., Young, N., Johnson, B.N., Khan, R.M., Bensafi, M., and Sobel, N. (2002). Olfactory plasticity: one nostril knows what the other learns. *Nature* 419, 802.

45. Martin, C., Houitte, D., Guillermier, M., Petit, F., Bonvento, G., and Gurden, H. (2012). Alteration of sensory-evoked metabolic and oscillatory activities in the olfactory bulb of GLAST-deficient mice. *Frontiers in neural circuits* 6, 1.
46. Martinez, I., and Paredes, R.G. (2001). Only self-paced mating is rewarding in rats of both sexes. *Hormones and behavior* 40, 510-517.
47. McClintock, M.K., and Adler, N.T. (1978). The Role of the Female during Copulation in Wild and Domestic Norway Rats (*Rattus norvegicus*). *Behaviour* 67, 67-96.
48. McTavish, T.S., Migliore, M., Shepherd, G.M., and Hines, M.L. (2012). Mitral cell spike synchrony modulated by dendrodendritic synapse location. *Frontiers in computational neuroscience* 6, 3.
49. Meerts, S.H., Schairer, R.S., Farry-Thorn, M.E., Johnson, E.G., and Strnad, H.K. (2014). Previous sexual experience alters the display of paced mating behavior in female rats. *Hormones and behavior* 65, 497-504.
50. Merkle, F.T., and Alvarez-Buylla, A. (2006). Neural stem cells in mammalian development. *Current opinion in cell biology* 18, 704-709.
51. Miller, M.W., and Nowakowski, R.S. (1988). Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system. *Brain research* 457, 44-52.
52. Ming, G.L., and Song, H. (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70, 687-702.
53. Mori, K. (1987). Membrane and synaptic properties of identified neurons in the olfactory bulb. *Progress in neurobiology* 29, 275-320.
54. Mori, K., Matsumoto, H., Tsuno, Y., and Igarashi, K.M. (2009). Dendrodendritic synapses and functional compartmentalization in the olfactory bulb. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1170, 255-258.
55. Morita, M., Kozuka, N., Itofusa, R., Yukawa, M., and Kudo, Y. (2005). Autocrine activation of EGF receptor promotes oscillation of glutamate-induced calcium increase in astrocytes cultured in rat cerebral cortex. *Journal of neurochemistry* 95, 871-879.
56. Nieuwenhuys, R. (1967). Comparative anatomy of olfactory centres and tracts. *Progress in brain research* 23, 1-64.

57. Ochi, T., Nakatomi, H., Ito, A., Imai, H., Okabe, S., and Saito, N. (2016). Temporal changes in the response of SVZ neural stem cells to intraventricular administration of growth factors. *Brain research* 1636, 118-129.
58. Oya, S., Yoshikawa, G., Takai, K., Tanaka, J., Higashiyama, S., Saito, N., Kirino, T., and Kawahara, N. (2008). Region-specific proliferative response of neural progenitors to exogenous stimulation by growth factors following ischemia. *Neuroreport* 19, 805-809.
59. Paredes, R.G. (2009). Evaluating the neurobiology of sexual reward. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* 50, 15-27.
60. Paredes, R.G., and Alonso, A. (1997). Sexual behavior regulated (paced) by the female induces conditioned place preference. *Behavioral neuroscience* 111, 123-128.
61. Paredes, R.G., and Vazquez, B. (1999). What do female rats like about sex? Paced mating. *Behavioural brain research* 105, 117-127.
62. Persson, A.I., Bull, C., and Eriksson, P.S. (2006). Requirement for Id1 in opioid-induced oligodendrogenesis in cultured adult rat hippocampal progenitors. *The European journal of neuroscience* 23, 2277-2288.
63. Persson, A.I., Thorlin, T., Bull, C., and Eriksson, P.S. (2003). Opioid-induced proliferation through the MAPK pathway in cultures of adult hippocampal progenitors. *Molecular and cellular neurosciences* 23, 360-372.
64. Petreanu, L., and Alvarez-Buylla, A. (2002). Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 6106-6113.
65. Pfaff, D., and Keiner, M. (1973). Atlas of estradiol-concentrating cells in the central nervous system of the female rat. *The Journal of comparative neurology* 151, 121-158.
66. Pfaff, D.S.-G.S. (1988). Cellular Mechanisms of Female Reproductive Behaviors. In *The Physiology of Reproduction* (New York: Raven Press).
67. Pfaff, D.W., and Sakuma, Y. (1979). Deficit in the lordosis reflex of female rats caused by lesions in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *The Journal of physiology* 288, 203-210.
68. Pleim, E.T., and Barfield, R.J. (1988). Progesterone versus estrogen facilitation of female sexual behavior by intracranial administration to female rats. *Hormones and behavior* 22, 150-159.

69. Portillo, W., Antonio-Cabrera, E., Camacho, F.J., Diaz, N.F., and Paredes, R.G. (2013). Behavioral characterization of non-copulating male mice. *Hormones and behavior* 64, 70-80.
70. Price, J.L., and Powell, T.P. (1970). The morphology of the granule cells of the olfactory bulb. *Journal of cell science* 7, 91-123.
71. Reynolds, B.A., and Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707-1710.
72. Rosser, A.E., Remfry, C.J., and Keverne, E.B. (1989). Restricted exposure of mice to primer pheromones coincident with prolactin surges blocks pregnancy by changing hypothalamic dopamine release. *Journal of reproduction and fertility* 87, 553-559.
73. Rubin, B.S., and Barfield, R.J. (1980). Priming of estrous responsiveness by implants of 17 beta-estradiol in the ventromedial hypothalamic nucleus of female rats. *Endocrinology* 106, 504-509.
74. Sakuma, Y., and Akaishi, T. (1987). Cell size, projection path, and localization of estrogen-sensitive neurons in the rat ventromedial hypothalamus. *Journal of neurophysiology* 57, 1148-1159.
75. Scalia, F., and Winans, S.S. (1975). The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *The Journal of comparative neurology* 161, 31-55.
76. Shepherd, G.M. (1972). Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb. *Physiological reviews* 52, 864-917.
77. Speca, D.J., Lin, D.M., Sorensen, P.W., Isacoff, E.Y., Ngai, J., and Dittman, A.H. (1999). Functional identification of a goldfish odorant receptor. *Neuron* 23, 487-498.
78. Swanson, L.W., and Petrovich, G.D. (1998). What is the amygdala? *Trends in neurosciences* 21, 323-331.
79. Terkel, J., and Sawyer, C.H. (1978). Male copulatory behavior triggers nightly prolactin surges resulting in successful pregnancy in rats. *Hormones and behavior* 11, 304-309.
80. Tropepe, V., Craig, C.G., Morshead, C.M., and van der Kooy, D. (1997). Transforming growth factor-alpha null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17, 7850-7859.

81. Urban, N.N., and Arevian, A.C. (2009). Computing with dendrodendritic synapses in the olfactory bulb. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1170, 264-269.
82. Vargas-Barroso, V., Ordaz-Sanchez, B., Pena-Ortega, F., and Larriva-Sahd, J.A. (2015). Electrophysiological Evidence for a Direct Link between the Main and Accessory Olfactory Bulbs in the Adult Rat. *Front Neurosci* 9, 518.
83. Weiler, E., McCulloch, M.A., and Farbman, A.I. (1999). Proliferation in the vomeronasal organ of the rat during postnatal development. *The European journal of neuroscience* 11, 700-711.
84. Weissman, I.L., Anderson, D.J., and Gage, F. (2001). Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annual review of cell and developmental biology* 17, 387-403.
85. Whalen, R.E. (1974). Estrogen-progesterone induction of mating in female rats. *Hormones and behavior* 5, 157-162.
86. Xu, F., Schaefer, M., Kida, I., Schafer, J., Liu, N., Rothman, D.L., Hyder, F., Restrepo, D., and Shepherd, G.M. (2005). Simultaneous activation of mouse main and accessory olfactory bulbs by odors or pheromones. *The Journal of comparative neurology* 489, 491-500.
87. Zhang, Y., Loh, H.H., and Law, P.Y. (2016). Effect of Opioid on Adult Hippocampal Neurogenesis. *ScientificWorldJournal* 2016, 2601264.
88. Zheng, W., Nowakowski, R.S., and Vaccarino, F.M. (2004). Fibroblast growth factor 2 is required for maintaining the neural stem cell pool in the mouse brain subventricular zone. *Developmental neuroscience* 26, 181-196.
89. Zigova, T., Pencea, V., Wiegand, S.J., and Luskin, M.B. (1998). Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Molecular and cellular neurosciences* 11, 234-245.



Incorporation of new neurons in the olfactory bulb after paced mating in the female rat



R. Alvarado-Martínez, R.G. Paredes*

Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus UNAM-Juriquilla, Blvd Juriquilla 3001, 76230

ARTICLE INFO

Keywords:

Neurogenesis
Paced mating (PM)
Non-paced mating (NPM)
Accessory olfactory bulb (AOB)
Main olfactory bulb (MOB)

ABSTRACT

One of the regions that constantly produces neurogenesis in the adult brain is the subventricular zone (SVZ), whose new cells migrate to the olfactory bulbs (OB). When the females regulate the copulatory events (paced mating) the number of new cells in the SVZ increases, as well as those observed in the OB 15 days later. However, no changes were observed in the number of cells 45 days after the females paced the sexual interaction. Constant sensory stimulation is an important promoter of cell survival in the OB circuit. Hence, we increased the number of mating sessions in this study to cover the period where stimulation of the new cells is critical for their incorporation into pre-existing circuits in the OB. Ovariectomized female Wistar rats, were injected with the mitotic marker 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, 100 mg/kg, per injection) before, at the end and one hour after mating. Sexual behavior was recorded for 1 h in 10 weekly sessions. After the last mating session, brain sections were processed to determine BrdU immunoreactivity. Our results indicate that females that paced the sexual interaction for 10 sessions had a higher number of cells in the glomerular layer (GL) of the accessory olfactory bulb (AOB) and a higher number of neurons in the granular layer (GrL) of the main olfactory bulb (MOB) in comparison to the control group. These results indicate that continued sexual interaction contributes to the integration of new cells and neurons, induced in the first sexual experience, into pre-existing circuits of the OB.

1. Introduction

In natural, semi-natural and laboratory conditions, female rats can control the frequency of copulatory events they received in a sexual interaction [1,2], a condition known as paced mating (PM). Thus, in the laboratory it is possible to study female sexual behavior in two modalities, PM and non-paced mating (NPM) [1,3,4]. Both copulatory paradigms promote different behavioral responses in the female. When the females control, or pace, the copulatory contacts, they receive fewer intromissions and ejaculations and show a higher inter-intromission interval than females that mate without pacing the sexual interaction [3,5]. It has been reported that PM induces several physiological changes that favor reproduction [6], and also induces a positive reward state, evaluated by the conditioned place preference paradigm [7,8]. As well, PM increases the release of luteinizing hormone, oxytocin and prolactin, hormones associated with ovulation and pregnancy [9,10]. It also increases the expression of c-Fos in several nuclei relevant for sexual behavior such as the medial amygdala (MeAD), the medial preoptic area (MPOA) and the nucleus accumbens (NAcc) [11].

PM also induces plastic changes such as neurogenesis in the sub-

ventricular zone, rostral migratory stream (RMS) olfactory bulb (OB) system [3,4]. One PM session induces a higher number of cells in the RMS 2 days after mating [12] and in the granular layer (GrL) of the AOB 15 days after the sexual interaction [3]. If the stimulus is repeated and females mate 4 times in PM conditions a higher number of cells and neurons is observed in comparison to the females that PM in one session. Moreover, a significantly higher number of cells and neurons is observed in other layers of the AOB and MOB [4]. Subsequent experiments evaluated the survival of the new cells and neurons in the OB 45 days after 1 PM session. No differences were found in the number of cells, but a significant increase in the number of neurons in the GrL of the AOB was observed after 1 PM session [12]. Thus, these results suggest that the cellular increase observed 15 days after 1 PM session is not sufficient to maintain the survival of the new cells 45 days after mating.

It is well established that olfactory input modulates neurogenesis in different brain regions, including the olfactory bulbs, reviewed in [13]. For example, enrich olfactory environments enhance the survival of new neurons that reach the OB [14]. Exposure to pheromones enhances the survival of new neurons in the AOB, indicating that the survival of

* Corresponding author at: Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus UNAM-Juriquilla, Blvd Juriquilla 3001, 76230.
E-mail address: rparedes@unam.mx (R.G. Paredes).

the new cells is regulated by olfactory input [15]. On the other hand, naris occlusion reduces BrdU-IR neurons that reach different layers of the MOB. In the present study, we extended the number of PM sessions to 10 (PM10s), covering the critical period of cell incorporation and survival described for the OB, in order to determine if the repetition of the stimulus that originated the cellular increase in the first mating session, promotes cellular survival 45 days later. We also evaluated possible changes in neuronal differentiation associated with mating in the MOB and AOB.

2. Experimental procedures

2.1. Animals

Female Wistar rats (200–250 g) without sexual experience and sexually experienced males (300–350 g) of the same strain, were obtained from the local colony at the Instituto de Neurobiología of the UNAM, and were maintained at a temperature of 25 °C. The females were anesthetized with a mixture of 30% Ketamine (95 mg/kg, Procin) and 70% Xylazine (12 mg/kg, Cheminova) before they were ovariectomized (OVX). One week after their recovery, and to induce sexual receptivity, female rats were supplemented with estradiol benzoate (EB, 25 µg/kg, Sigma Aldrich) and progesterone (P, 1 mg/kg,.) 48 and 4 h respectively, before each behavioral session. Female rats were randomly assigned to one of the following five groups: (1) Control group (Females placed alone in a mating cage with clean sawdust, N = 11); (2) Exposed: Females placed in a mating cage exposed to a sexually experienced male without the possibility of physical contact (N = 7); (3) Paced mating in 5 sessions, females that mated in five sessions in a 16-day interval controlling the sexual interaction (PM5s, N = 11); (4) Paced mating in 10 sessions, females that mated in ten sessions in a 45 day interval (PM10s, N = 11); (5) Females that mated without the possibility of pacing the sexual interaction for 10 sessions in a 45-day interval (NPM10s, N = 11). All 51 experimental females were sacrificed 45 days after the first sexual behavior test and administration of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) (Fig. 1A). All experiments were carried out in accordance with the “Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud” of the Mexican Health Ministry, which follows NIH guidelines and were approved by the Bioethics Committee of the Instituto de Neurobiología.

2.2. Administration of BrdU

To identify the new cells originated by sexual behavior, we used the nucleoside analogue of thymine, BrdU, which is incorporated into the

DNA of the cells during the synthesis phase of cell division. In the first behavioral session, BrdU (Sigma Aldrich) was injected intraperitoneally three times at a concentration of 100 mg/kg in a 0.9% NaCl solution [3]. The BrdU administration protocol started with the first injection one hour before the first behavioral test, the second injection was applied immediately after the behavioral test and the last dose was applied one hour later for a total dose of 300 mg/kg (Fig. 1B). For the PM5s group, females were housed in their home cage immediately after the fourth mating test until day 45 when the last PM session was done, thus having five PM sessions in total. All animals were sacrificed on day 45 after the first behavioral test and BrdU injection.

2.3. Mating tests

For the behavioral tests, an acrylic box (40 cm × 60 cm × 40 cm) was used. In the case of the PM tests, an acrylic barrier was placed in the middle of the box with a hole large enough (7 cm in diameter) to allow the female, not the male, to go back and forth. The female rat was able to move between both compartments, thus controlling the sexual interaction with the male. For the NPM tests the animals mated without the barrier, allowing the male, not the female, to control the frequency and number of sexual contacts [1,3].

The following parameters were recorded: number of mounts, number of intromissions, number of ejaculations; latency to mount, intromit and ejaculate, defined as the time required by the male to display the first sexual event of each type. We also calculated the inter-intromission interval (III), which results from dividing the latency of ejaculation by the number of intromissions received in each ejaculatory series. To determine the level of receptivity of the female, a modified classification of dorsiflexion was used [16]. A score of 0 was assigned when the female showed no change in posture in response to a mount by the male; 1 when the dorsiflexion was moderate, forming a line parallel to the ground; and 2 when the dorsiflexion was pronounced and the head was raised backward. Two parameters were obtained: the lordosis intensity (IL) and the lordosis quotient (LQ). The latencies to return to the male side and the percentages of exits after a mount, an intromission or an ejaculation were recorded. Each behavioral test lasted 1 h.

Forty-five days after the administration of BrdU and 90 min after the last behavioral test (PM5s, PM10s, NPM10s), all groups were administered a lethal dose of sodium pentobarbital (100 mg/kg, Cheminova) and subsequently perfused intracardially with a phosphate-buffered solution (PBS 0.1 M, 250 ml, pH 7.42) followed by 4% paraformaldehyde (300 ml, Sigma Aldrich) in a 0.1 M PBS solution. The brains were extracted and postfixed for one hour in paraformaldehyde,

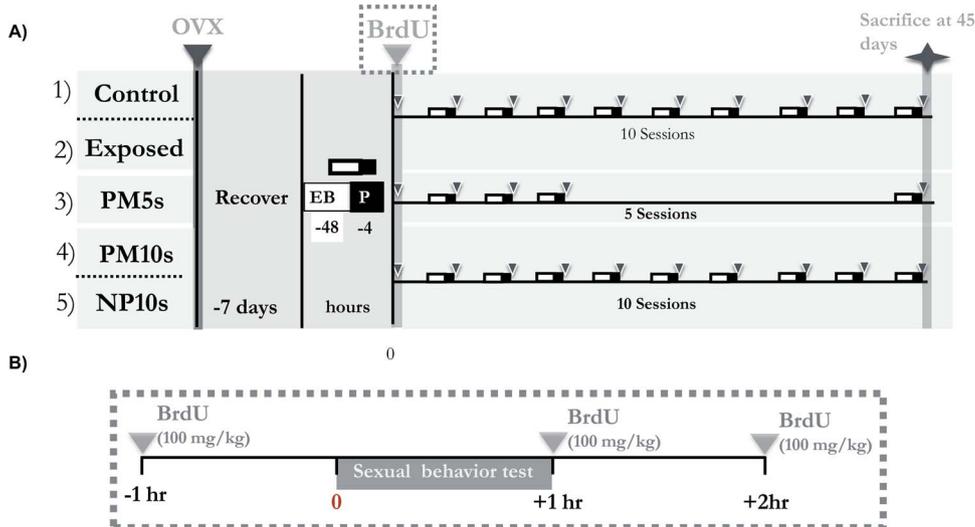


Fig. 1. Schematic representation of the procedure for the different groups of animals. (A) All subjects were ovariectomized (OVX) at least 7 days before the experiment. They were injected with BrdU in the first test and sacrificed 45 days later. (B) BrdU was injected 1 h before the behavioral test (100 mg/kg), at the end of the test (100 mg/kg) and 1 h after the test (100 mg/kg).

they were then cryoprotected with a 30% sucrose solution, until they were cut in a microtome (Leica, SM200R). Parasagittal sections of each hemisphere of 30 μm , including the AOB and MOB were collected.

2.4. Immunohistochemistry

2.4.1. Detection of BrdU labeled cells with peroxidase

Following our previously reported protocols [3,4,12,17], we performed immunohistochemistry for BrdU in four sections per rat. Briefly, tissues were washed 4 times in Tris-buffered saline (TBS 0.1M, Ph 7.6, J. T Baker) and incubated in sodium borohydride (0.5%, Sigma-Aldrich). Later brain sections were incubated in Triton X-100 (0.1%, J.T Baker) and 30% H_2O_2 (1%, J.T Baker) followed by incubation in Dimethyl Sulfoxide (DMSO 1%, J.T Baker). Tissue was incubated in 2N HCL (J.T. Baker) for one hour at 37 °C to denaturalize the DNA. The slices were then incubated with 0.5% sodium borohydride (Sigma Aldrich) for 15 min to neutralize HCL. To avoid possible non-specific immunodetection, the tissue was blocked with a 0.1% bovine albumin solution (Sigma Aldrich) and 0.03% Triton X-100 (J.T. Baker). The mouse anti-BrdU primary antibody (BD Biosciences) was incubated at a concentration of 1:2000 in a 0.1% bovine albumin solution and 0.032% Triton X-100, under agitation for 16 h at 4 °C. The sections were then rinsed and incubated at room temperature for two hours in the mouse anti-mouse IgG (vector) biotinylated secondary antibody at a concentration of 1:500 with 0.1% albumin and Triton X-100 (0.032%). The tissue was then incubated in Avidin-Biotin-Complex (ABC, Vector Laboratories) for 90 min. Brain slices were rinsed and placed in a solution of 0.6% nickel chloride-3,3'-diaminobenzidine (DAB, Vector Laboratories), 0.072% hydrogen peroxide and 10% nickel. The reaction was stopped by washing the sections in TBS. Finally, the brain sections were mounted on gelatin-coated slides and cover slipped using permount (Fisher Scientific).

2.4.2. Double labeled BrdU-NeuN

To determine the number of new cells that differentiate into mature neurons, sections were rinsed in TBS, incubated in 2N hydrochloric acid for 30 min at 37 °C. Then they were incubated in a solution of H_2O_2 at 1% for 30 min. Prior to incubation of the antibodies, tissue was incubated for 30 min with casein (Perkin Elmer). Brain sections were incubated with anti-BrdU antibody (rat 1:800, AbD Serotec) and mouse monoclonal biotinylated anti-neuronal nuclei antibody (NeuN) (1:800, Millipore), simultaneously for 48 h at 4 °C. Samples were incubated with anti-rat secondary antibody Alexa-488 dye (1:1250 Invitrogen) for 2 h in a dark room. NeuN, was detected by incubation with ABC complex and revealed using tyramide signal amplification (TSATM) plus Cyanine3 System (Perkin Elmer) (1:100) in a moist chamber under agitation for 15 min. Sections were washed in TBS for 24 h and mounted on slides with Aqua Poly/Mount medium (Polysciences).

2.5. Quantification of immunoreactive cells

Photographic reconstructions of the complete OB were obtained with an Olympus BX60F-3 microscope using a 10X objective and a LSM 700 Zeiss confocal microscope using a 25X objective. To determine the number of new cells, the image analysis program ImagePro 6.1 was used. Cells were counted in the area of interest (AOIs), represented by circles of 400 μm^2 and 200 μm^2 , for MOB and AOB, respectively (Fig. 2). The AOIs in the MOB were three circles per layer, in the glomerular layer (GL), mitral layer (ML) and granular layer (GrL). In the AOB, six circles per layer were placed, at the GL, ML and GrL [3]. Quantification was performed semiautomatically, where the immunoreactive cells against BrdU were identified, counted and expressed as the number of new cells per mm^2 . We analyzed seven rats per group and four sections per rat. In the case of immunofluorescence, we quantified the new neurons in a total of 4 slices per animal in 5 subjects per group. The total number of BrdU-IR positive cells in the AOIs corresponds to 100%.

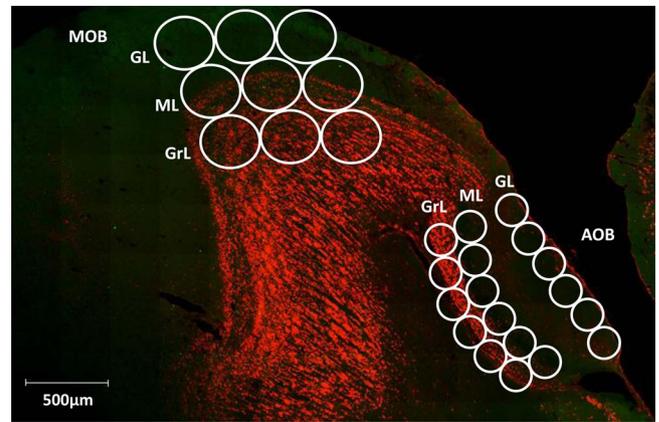


Fig. 2. Representation of the areas of interest (AOIs) in the main olfactory bulb (MOB) and the accessory olfactory bulb (AOB) where cells were counted in the glomerular cell layer (GL), mitral cell layer (ML) and granular cell layer (GrL) of the main and accessory olfactory bulbs (MOB, AOB).

Those double label with BrdU and NeuN (Fig. 3) are reported as percentage of the total BrdU cells. Colocalization was verified with the orthogonal tool using Zen 2012 software (Fig. 4).

2.6. Statistical analysis

Since most of the data had no homogeneity of variance or normal distribution, we used nonparametric tests. The average of the different behavioral parameters for the groups displaying sexual behavior as well as the number of BrdU-IR cells per layer were analyzed by a Kruskal-Wallis test and in the case of significant differences, the Dunn test was performed as Post-hoc. A chi squared test (χ^2), followed by a Fisher's test, was used to determine possible significant differences in the percentage of BrdU-NeuN-IR cells found by confocal microscopy. In all cases a significant difference was considered when $p \leq .05$. The statistical analysis was done with Sigma Plot 11.0 software.

3. Results

3.1. Sexual behavior

For each behavioral parameter, we obtained the average of the sessions corresponding to each group, 10 sessions for PM10s and NPM10s groups and 5 sessions for the PM5s group. Significant differences were found between the NP10s group and those that paced the sexual interaction (PM5s and PM10s). The number of intromissions was significantly higher (KW: $H(2) = 7,282$, $p = .026$) in the group that did not pace the sexual interaction (NPM10s) in comparison to the groups that paced the sexual interaction: PM5s ($Q = 2.192$), PM10s ($Q = 2.379$). The number of ejaculations was also higher in the NPM10s group (KW: $H(2) = 6.95$, $p = .05$) in comparison to the PM5s ($Q = 2.591$) and PM10s ($Q = 2.657$;) groups. The interintromission interval was significantly reduced in the NPM10s group (KW: $H(2) = 7.045$, $p = .030$) in comparison to the PM5s ($Q = 2.332$) and PM10s ($Q = 2.429$) groups (Table 1). These differences agree with literature that compares PM and NPM. No differences were found in any other variables between the NPM group and PM groups. Moreover, no differences were found in the lordosis quotient or in the mean lordosis intensity, indicating that female rats from all groups exhibit the same levels of receptivity and proceptivity. There were no significant differences between the PM10s and PM5s groups regarding the behavioral parameters associated with paced mating, such as return latencies or percentage of exits after mount, intromission or ejaculation (Table 1).

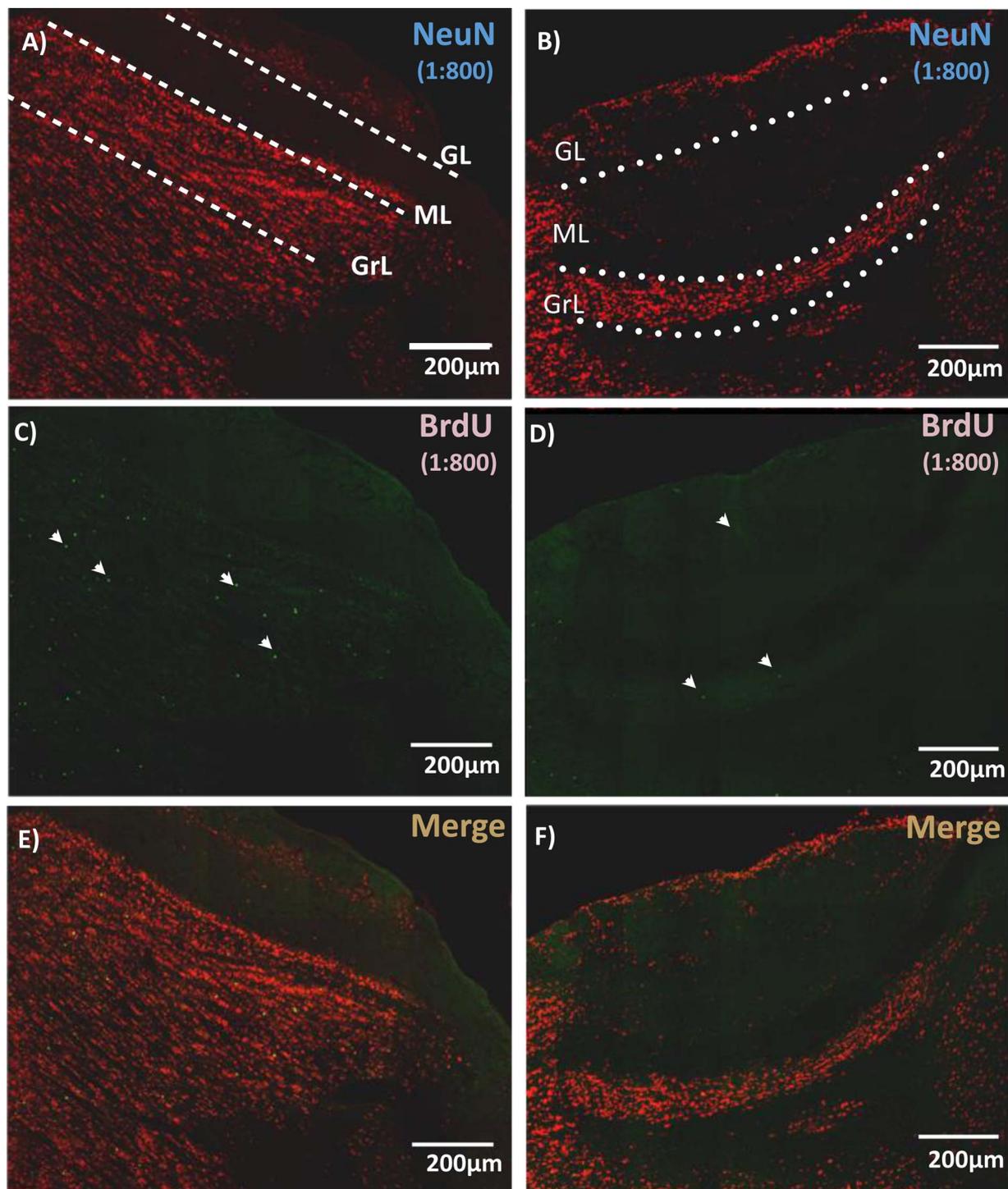


Fig. 3. (A and B) Representative photomicrographs showing NeuN-IR positive cells in the MOB (left panel) and AOB (right panel). (C–D) BrdU-IR cells indicated by white arrows and (E and F) their colocalization. Glomerular cell layer (GL); Mitral cell layer (ML) and granular cell layer (GrL).

3.2. Quantification of BrdU immunoreactive cells

No significant differences were found between groups in the three layers of the MOB (Fig. 5). In the GL of the AOB a significant increase in the number of BrdU-IR cells was observed in the PM10s group ($U = 140$, $p = .04$) in comparison to the control group (Fig. 6). No significant differences were found in the ML and GrL.

3.3. Quantification of BrdU-NeuN immunoreactive cells

Since we did not find significant differences in the number of cells in the exposed and PM5s groups the immunofluorescence analysis was done in the control, PM10s and NPM10s groups. A higher percentage of new neurons was observed in the GrL of the MOB in the PM10s group in comparison to the control group ($X_2 = 4.48$; $p < .025$). No significant differences were found in the other layers of the main or accessory olfactory bulbs (Table 2).

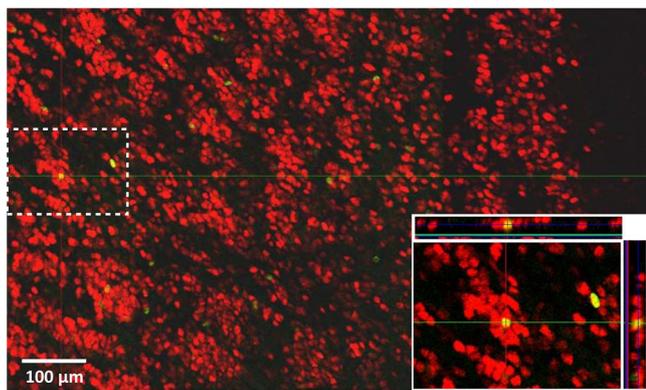


Fig. 4. Acquisition of confocal images in the granular layer of the MOB, including immunoreactive cells for BrdU and NeuN simultaneously (merge in yellow), with a higher magnification (bottom right) in the orthogonal plane. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 1

Average of the sexual behavior parameters in the groups that paced the sexual interaction for 5 (PM5s) or 10 (PM10s) sessions and in the group that did not pace the sexual interaction (NPM10s). Data are expressed as mean ± SEM.

Behavioral measures	Groups		
Number	PM5s	PM10s	NPM10s
Mounts	31.88 ± 3.33	31.56 ± 3.39	46.21 ± 4.92
Intrusions	24.96 ± 2.18	28.66 ± 2.29	36.66 ± 2.93*
Ejaculations	2.67 ± 1.02	2.84 ± 0.98	3.83 ± 1.01†
Latencies (sec)			
Mounts	176.57 ± 11.40	130.48 ± 8.03	115.09 ± 10.24
Intrusions	256.31 ± 15.54	181.52 ± 9.34	140.68 ± 9.27
Ejaculations	1295.00 ± 22.16	1214.34 ± 19.71	907.09 ± 21.53
III (sec)	92.76 ± 5.31	79.71 ± 4.16	57.19 ± 4.75*
MLI	1.92 ± 0.16	1.85 ± 0.31	1.91 ± 0.27
LQ	99.23 ± 0.78	96.70 ± 1.76	97.77 ± 1.61
Return latency (sec) after			
Mounts	17.29 ± 2.58	14.29 ± 2.02	
Intrusions	55.10 ± 3.84	46.79 ± 3.08	
Ejaculations	172.11 ± 9.08	179.30 ± 6.61	
Percentage of exits after			
Mounts	44.06 ± 3.47	48.35 ± 3.09	
Intrusions	66.52 ± 3.58	80.38 ± 2.11	
Ejaculations	100.00 ± 0.00	99.57 ± 1.79	

* Different from the pacing groups; p < .05.

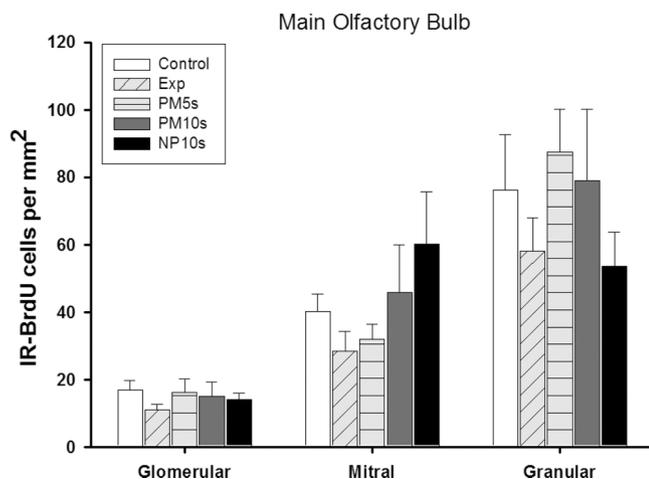


Fig. 5. Number of BrdU positive cells in the different groups of animals in the layers of the main olfactory bulb. (Data are expressed as mean ± SEM.).

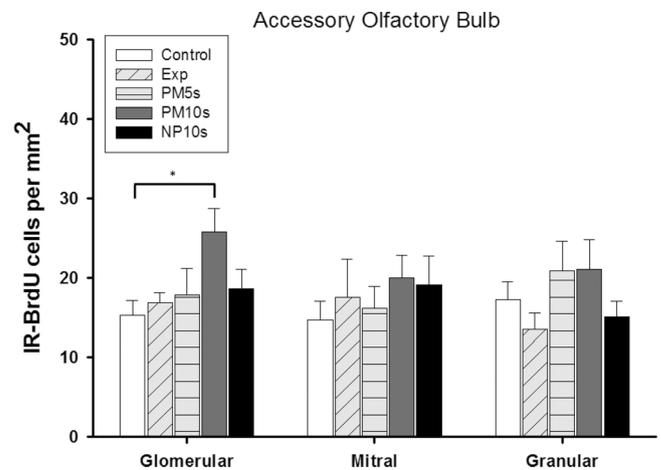


Fig. 6. Number of BrdU positive cells in the different groups of animals in the different layers of the accessory olfactory bulb. (Data are expressed as mean ± SEM).

* Different from the control group in the same layer.

Table 2

Percentage of new neurons in the accessory olfactory bulb (AOB) and main olfactory bulb (MOB) after 10 sessions of paced (PM10s) and non-paced mating (NPM10s).

	Layer	Control	PM10s	NPM10s
AOB	GL	35.57 ± 11.51	37.65 ± 4.66	36.95 ± 6.49
	M	20.88 ± 11.47	19.61 ± 7.58	18.96 ± 9.65
	GrL	32.81 ± 10.89	35.41 ± 4.32	34.64 ± 10.84
MOB	GL	29.81 ± 9.53	39.57 ± 14.15	34.36 ± 23.77
	M	60.47 ± 12.94	63.55 ± 14.10	65.38 ± 7.60
	GrL	41.65 ± 6.87	72.67 ± 4.64*	60.23 ± 5.50

* Different from control group in the same layer; p < .05.

4. Discussion

Neurogenesis is a complex physiological process involving diverse cellular mechanisms, as well as hormones and trophic factors that facilitate cell proliferation in neurogenic niches of the adult brain. As described in the introduction, neurogenesis is modulated by various stimuli, including PM. When the females paced the sexual interaction a higher number of cells was observed in the GrL of the AOB 15 days after the mating test [3]. However, the cells originated under this condition were not capable of surviving at day 45, because no increase in the number of cells was observed in the OB [12]. When the number of PM sessions was increased, a higher number of new cells that reached the OB in the ML and GrL of both the MOB and the AOB was observed, 15 days after mating [4]. The hypothesis presented in this study suggests that repeated sensory paced sexual stimulation (PM10s) is necessary to facilitate cell survival until day 45. The results obtained support our hypothesis because we found an increase in the number of new cells (BrdU IR) in the GL of the AOB in the PM10s group. No effect was observed in the group exposed to a sexually experienced male confirming previous observations from our group [3,12]. As described in the introduction exposure to male pheromones stimulates neurogenesis, but the exposure must be for long periods, 2 days or more [18,19]. In the present experiment females were exposed to the male for 1 h once weekly for 10 weeks, without the possibility of physical contact. This type of olfactory stimulation is not sufficient to induce more cells in the OB.

Interestingly, the increase was observed in the GL and not in the ML or GrL as observed 15 days after mating [4]. A possible explanation for these differences could be the time necessary for the cells to migrate and incorporate into pre-existing circuits. According to the literature, between 15 and 22 days after birth, the new cells can be located primarily in the GrL and/or ML [20,21]. This is consistent with our

previous report where we found new cells in the GrL and ML 15 days after 4 PM sessions [4]. It is possible that these cells may require more time to reach the GL if this was its destination, an observation that would be consistent with our findings at 45 days (PM10s).

We did not find a change in the proportion of double-labeled BrdU/NeuN cells in the AOB in the PM10s group compared to the control group by means of confocal microscopy, suggesting that these cells had another cellular compromise, possibly to glia. It has been shown that cells that proliferate in the SVZ can differentiate into neurons or glia [22]. There are reports indicating that astrocytes in the GL of the MOB play a homeostatic role in synaptic transmission between periglomerular cells and projecting cells, Mitral and tufted cells [23], and are crucial for adequate processing of common odors. On the other hand, the glia cells of the AOB can act as modulators of the information that animals receive during a sexual experience including the reproductive state of the con-specific [24,25]. In the case of the MOB, we did not find a significant increase in the number of BrdU-IR cells in any of the experimental groups. When confocal microscopy was used, we found a significant increase in the proportion of new neurons (double labeled cells) in the GrL of the group that paced the sexual interaction for 10 sessions (the PM10s). The granular cells are crucial for processing and discrimination of olfactory cues [26]. No changes were observed in the number of cells or neurons in the group not allowed to pace the sexual interaction (NPM10s) for 10 sessions. Similar observations were found when females mated once and were sacrificed 15 [3] or 45 [12] days later. It is clear then, that the quality of stimulation induced by paced mating induced plastic changes that are not observed when females do not pace the sexual interaction.

The possibility to pace the sexual interaction reduces the aversive consequences of mating reflected in a longer inter intromission interval, reduced number of intromissions and ejaculations and an increase in the return latencies after contact with a male. These differences were observed in the present experiment being consistent with previous studies [1,7]. The reward state induced by PM is blocked by the systemic administration of naloxone in both males [27] and females [28], suggesting that a common opioid system mediates sexual reward [29]. The intracerebral administration of naloxone in brain areas that regulate female sexual behavior such as the ventromedial hypothalamus, the amygdala and the medial preoptic area also blocked the reward state induced by PM [30]. Moreover, the neurogenesis induced by PM in the OB is blocked by the systemic injection of naloxone before the first sexual behavior session [31], suggesting that the neurogenesis induced by PM is opioid dependent. There is substantial evidence indicating that opioids modulate astroglial and neuronal proliferation, review in [32]. There is also evidence indicating that endogenous opioids regulate neurotrophic factors [33,34]. It has been shown that the administration of the fibroblast growth factor 2 in combination with epidermal growth factor increases cell proliferation in the SVZ, the dentate gyrus and hypothalamus after ischemia [35]. In another study it was demonstrated that administration of these factors for 7 days produced a significant increase in cell proliferation. However, if these growth factors were administered for 14 days a reduction in cell proliferation was observed [36]. These observations could explain at least in part the results of our experiments. With one or four sessions of PM an increase in the number of cells that reach the OB is observed, but if the opioid system is over stimulated in multiple paced mating sessions (present study) no increase in the number of cells is observed. Our results suggest that the effects of factors or stimuli that induce neurogenesis not only depend on the frequency of the stimulation, in our case the number of PM sessions, but the temporal presentation is a key factor in the system. A short early stimulation, a presentation window of 15 days, induces neurogenesis in the GrL and ML of the AOB and MOB [3,4], but if the stimulation is presented after those 15 days, a higher number of cells is observed in the GL of the AOB and higher number of neurons in the GrL of the MOB, indicating that both the temporal and frequency of sexual stimulation induces site specific neurogenesis in the

OB. Only future studies could test this hypothesis.

Previous studies demonstrated that females injected with BrdU on the day of the behavioral test had a higher number of neurons in the OB 45 days later when the new neurons incorporate into pre-existing circuits. These neurons, labeled at the time of the sexual behavior test, were activated as evaluated by Fos expression, in a second sexual behavior test [12]. Further studies are needed to determine if the new cells and neurons induced by paced mating are also activated by other stimuli, such as sexually relevant olfactory cues, to understand the role of these new cell and neurons.

Funding

Research supported by: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) grants 253631, Fronteras 374 and UNAM-DGAPAIN210215, IN203518.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest

Acknowledgments

We thank Wendy Portillo for the critical review of the manuscript. We also thank Francisco Camacho, Deisy Gasca, Alejandra Castilla, Leonor Casanova, Ramón Martínez, Ma. De Lourdes Lara, Martín García, Francisco Javier Valles and Elsa Nydia Hernández for their excellent technical assistance.

Reynaldo Abraham Alvarado Martínez is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 245202 from CONACYT.

References

- [1] M.S. Erskine, Solicitation behavior in the estrous female rat: a review, *Horm. Behav.* 23 (1989) 473–502.
- [2] M.K. McClintock, N.T. Adler, The role of the female during copulation in wild and domestic Norway rats (*Rattus norvegicus*), *Behaviour* 67 (1978) 67–96.
- [3] R. Corona, J. Larriva-Sahd, R.G. Paredes, Paced-mating increases the number of adult new born cells in the internal cellular (granular) layer of the accessory olfactory bulb, *PLoS One* 6 (2011) e19380.
- [4] D.M. Arzate, W. Portillo, R. Corona, R.G. Paredes, Repeated paced mating promotes the arrival of more newborn neurons in the main and accessory olfactory bulbs of adult female rats, *Neuroscience* 232 (2013) 151–160.
- [5] R.G. Paredes, B. Vazquez, What do female rats like about sex? Paced mating, *Behav. Brain Res.* 105 (1999) 117–127.
- [6] M. Diamond, Intromission pattern and species vaginal code in relation to induction of pseudopregnancy, *Science* 169 (1970) 995–997.
- [7] R.G. Paredes, A. Alonso, Sexual behavior regulated (paced) by the female induces conditioned place preference, *Behav. Neurosci.* 111 (1997) 123–128.
- [8] R.G. Paredes, Evaluating the neurobiology of sexual reward, *ILAR J.* 50 (2009) 15–27.
- [9] C.A. Blake, C.H. Sawyer, Effects of vaginal stimulation on hypothalamic multiple-unit activity and pituitary LH release in the rat, *Neuroendocrinology* 10 (1972) 358–370.
- [10] J. Terkel, C.H. Sawyer, Male copulatory behavior triggers nightly prolactin surges resulting in successful pregnancy in rats, *Horm. Behav.* 11 (1978) 304–309.
- [11] M.S. Erskine, S.B. Hanrahan, Effects of paced mating on c-fos gene expression in the female rat brain, *J. Neuroendocrinol.* 9 (1997) 903–912.
- [12] R. Corona, S. Retana-Marquez, W. Portillo, R.G. Paredes, 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, *Front. Neurosci.* 10 (2016) 48.
- [13] G.M. Arisi, M.L. Foresti, S. Mukherjee, L.A. Shapiro, The role of olfactory stimulus in adult mammalian neurogenesis, *Behav. Brain Res.* 227 (2012) 356–362.
- [14] C. Rochefort, G. Gheusi, J.D. Vincent, P.M. Lledo, Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory, *J. Neurosci.* 22 (2002) 2679–2689.
- [15] L. Oboti, G. Savalli, C. Giachino, S. De Marchis, G.C. Panzica, A. Fasolo, P. Peretto, Integration and sensory experience-dependent survival of newly-generated neurons in the accessory olfactory bulb of female mice, *Eur. J. Neurosci.* 29 (2009) 679–692.
- [16] D.F. Hardy, J.F. DeBold, Effects of coital stimulation upon behavior of the female rat, *J. Comp. Physiol. Psychol.* 78 (1972) 400–408.
- [17] W. Portillo, N. Unda, F.J. Camacho, M. Sanchez, R. Corona, D.M. Arzate, N.F. Diaz,

- R.G. Paredes, Sexual activity increases the number of newborn cells in the accessory olfactory bulb of male rats, *Front. Neuroanat.* 6 (2012) 25.
- [18] G.K. Mak, E.K. Enwere, C. Gregg, T. Pakarainen, M. Poutanen, I. Huhtaniemi, S. Weiss, Male pheromone-stimulated neurogenesis in the adult female brain: possible role in mating behavior, *Nat. Neurosci.* 10 (2007) 1003–1011.
- [19] P. Peretto, R.G. Paredes, Social cues, adult neurogenesis, and reproductive behavior, in: C. Mucignat-Caretta (Ed.), *Neurobiology of Chemical Communication*, CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL), 2014.
- [20] G.L. Ming, H. Song, Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions, *Neuron* 70 (2011) 687–702.
- [21] L. Petreanu, A. Alvarez-Buylla, Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction, *J. Neurosci.* 22 (2002) 6106–6113.
- [22] C. Lois, A. Alvarez-Buylla, Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993) 2074–2077.
- [23] C. Martin, D. Houitte, M. Guillermier, F. Petit, G. Bonvento, H. Gurden, Alteration of sensory-evoked metabolic and oscillatory activities in the olfactory bulb of GLAST-deficient mice, *Front. Neural Circuits* 6 (2012) 1.
- [24] G.A. Coria-Avila, A.J. Ouimet, P. Pacheco, J. Manzo, J.G. Pfaus, Olfactory conditioned partner preference in the female rat, *Behav. Neurosci.* 119 (2005) 716–725.
- [25] G.F. Hammen, D. Turaga, T.E. Holy, J.P. Meeks, Functional organization of glomerular maps in the mouse accessory olfactory bulb, *Nat. Neurosci.* 17 (2014) 953–961.
- [26] T.S. McTavish, M. Migliore, G.M. Shepherd, M.L. Hines, Mitral cell spike synchrony modulated by dendrodendritic synapse location, *Front. Comput. Neurosci.* 6 (2012) 3.
- [27] A. Agmo, M. Gomez, Sexual reinforcement is blocked by infusion of naloxone into the medial preoptic area, *Behav. Neurosci.* 107 (1993) 812–818.
- [28] I. Martinez, R.G. Paredes, Only self-paced mating is rewarding in rats of both sexes, *Horm. Behav.* 40 (2001) 510–517.
- [29] R.G. Paredes, Opioids and sexual reward, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 121 (2014) 124–131.
- [30] S.P. Garcia-Horsman, A. Agmo, R.G. Paredes, Infusions of naloxone into the medial preoptic area, ventromedial nucleus of the hypothalamus, and amygdala block conditioned place preference induced by paced mating behavior, *Horm. Behav.* 54 (2008) 709–716.
- [31] M. Santoyo-Zedillo, W. Portillo, R.G. Paredes, Neurogenesis in the olfactory bulb induced by paced mating in the female rat is opioid dependent, *PLoS One* 12 (2017) e0186335.
- [32] T.J. Sargeant, J.H. Miller, D.J. Day, Opioidergic regulation of astroglial/neuronal proliferation: where are we now? *J. Neurochem.* 107 (2008) 883–897.
- [33] I. Tegeder, G. Geisslinger, Opioids as modulators of cell death and survival—unraveling mechanisms and revealing new indications, *Pharmacol. Rev.* 56 (2004) 351–369.
- [34] D.A. Eisinger, H. Ammer, Epidermal growth factor treatment switches delta-opioid receptor-stimulated extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 signaling from an epidermal growth factor to an insulin-like growth factor-1 receptor-dependent mechanism, *Mol. Pharmacol.* 79 (2011) 326–335.
- [35] S. Oya, G. Yoshikawa, K. Takai, J. Tanaka, S. Higashiyama, N. Saito, T. Kirino, N. Kawahara, Region-specific proliferative response of neural progenitors to exogenous stimulation by growth factors following ischemia, *Neuroreport* 19 (2008) 805–809.
- [36] T. Ochi, H. Nakatomi, A. Ito, H. Imai, S. Okabe, N. Saito, Temporal changes in the response of SVZ neural stem cells to intraventricular administration of growth factors, *Brain Res.* 1636 (2016) 118–129.