



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

**ESTUDIO DE LOS CAMBIOS PLÁSTICOS INDUCIDOS POR LA EXPERIENCIA SEXUAL EN
EL RATÓN HEMBRA.**

TESIS QUE PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

PAU MARCO MANCLUS

DIRECTORES DE TESIS:

DRA. WENDY PORTILLO MARTÍNEZ

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

DR. LUÍS CONCHA LOYOLA

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

DRA. MARGARITA MARTÍNEZ GÓMEZ

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO. NOVIEMBRE 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos:

Primeramente, quisiera agradecer a la Dra. Wendy Portillo Martínez, no solo por su apoyo y consejos durante mi investigación como mi tutora, sino también por su apoyo y dedicación como persona. También quiero agradecer a mis tutores Luis Concha Loyola y Margarita Martínez Gómez por sus consejos y acertadas correcciones a lo largo de todo mi proyecto. Quisiera hacer mención Red Olfativa Española, pues en un congreso de esta conocí a mi actual tutora y agradecer a mis tutores previos en la Universitat de València, Enrique Lanuza Navarro y Ferrán Martínez García (que me aconsejaron en la presentación inicial de este proyecto).

También agradezco el apoyo brindado por mis padres, Rosa Manclus Blasco y Domènec Marco Chiral, que siempre han estado ahí (a pesar de que nos separa un océano).

Tampoco quiero dejar la oportunidad de agradecer al Dr. Raúl G. Paredes, así como al resto de compañeros del laboratorio, por su apoyo. Así como aquellas personas con las que conviví, fuera y dentro del laboratorio, durante este largo período de mi vida.

También agradezco los valiosos comentarios de mis sinodales: el Dr. José Ramón Eguibar Cuenca, el Dr. Rodrigo Erik Escartín Pérez, la Dra. Tatiana Fiordeliso Coll, y la Dra. Gina Lorena Quirarte, que me ayudaron a mejorar mi tesis.

Mi agradecimiento también al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), y el apoyo recibido con la beca CONACYT 573405 (No. de apoyo 402275).

Quiero agradecer a Francisco Camacho, Deisy Gasca, Martin García, Alejandra Castilla, Nuri Aranda y Ma. De Lourdes Lara por su apoyo técnico. Este Proyecto recibió financiamiento de los proyectos CONACYT 252756 y UNAM-DGAPA-PAPIIT IN202818.

Índice de contenidos

1. **Lista de Abreviaturas**

2. **Abstract**

3. **Resumen**

4. **Antecedentes**

4.1. *Conducta sexual*

4.2. *Bulbo olfatorio*

4.2.1 Ontogenia

A) Desarrollo temprano

B) Desarrollo general del BO

C) Origen y migración de las células del BO

C.1) Neuronas de proyección del BOP

C.2) Interneuronas del BOP

C.3) Particularidades del BOA

D) Desarrollo embrionario y la organización multicapa del BO

E) Formación del glomérulo

4.2.2. Conexiones del BO y su función

A) Del epitelio olfativo al BOP

B) Del órgano vomeronasal al BOA

C) Conexiones del BO con estructuras sexualmente relevantes

C.1) Circuito cerebral de conducta sexual

C.2) Hipótesis Dual

4.2.3. El BO, una estructura plástica

4.2.4. C-Fos, el marcador de actividad neuronal

A) Propiedades generales de c-Fos

B) C-fos en el estudio de conducta sexual

4.2.5. Sinaptofisina

A) Propiedades generales de la sinaptofisina

B) Sinaptofisina en el estudio de conducta sexual

5. Justificación

6. Hipótesis

7. Objetivos

8. Método

8.1 Animales

8.2 Grupos experimentales

8.3 Histología

8.4. Inmunohistoquímica para c-Fos

8.5. Inmunofluorescencia para sinaptofisina

8.6. *Fotografía y análisis de imagen para c-Fos*

8.7. *Fotografía y análisis de imagen para sinaptofisina*

8.8. *Análisis estadístico*

9. Resultados

9.1. *Estudio para determinar la concentración óptima de estradiol para inducir receptividad sexual*

9.2. *Efecto de la experiencia sexual en la receptividad sexual del ratón hembra*

9.2.1. Conducta sexual

9.2.2. Expresión de c-Fos

A) Comparaciones intra-grupo

A.1) Bulbo Olfatorio Accesorio

A.2) Área preóptica medial

A.3) Hipotálamo ventromedial

B) Comparaciones inter-grupo

C) Correlaciones entre la conducta sexual y la expresión de c-Fos

9.2.3. Sinaptofisina

A) Bulbo Olfatorio

B) Bulbo Olfatorio Principal

C) Bulbo olfatorio accesorio

D) Regiones centrales involucradas en la modulación de la conducta sexual femenina

(APM, HVM y Me)

10. Discusión

10.1 Efecto de la experiencia sexual y el tratamiento hormonal en el ratón hembra

10.2 La facilitación de la lordosis puede implicar cambios en la activación neuronal

10.3 Cambios en la expresión de sinaptofisina en respuesta a la experiencia sexual

11. Conclusión

12. Futuras direcciones

13. Referencias

1. Lista de abreviaturas

3V	tercer ventrículo
Aca	comisura anterior, parte anterior
Aci	comisura anterior intrabulbar
ADN	ácido desoxiribonucleico
AHp	hipotálamo anterior, parte posterior
AMG	Amígdala
APM	área preóptica medial
ARN	ácido ribonucleico
BE	benzoato de estradiol
BO	bulbo olfatorio
BOA	bulbo olfatorio accesorio
BOAa	bulbo olfatorio accesorio, parte anterior
BOAp	bulbo olfatorio accesorio, parte posterior
BOP	bulbo olfatorio principal
BLA	amígdala basolateral
BMA	amígdala basomedial
BST	núcleo base de la estría terminal
CNO	capa de nervios olfativos
CL	cociente de lordosis
CPIE	Capa plexiforme externa
CPII	Capa plexiforme interna
CUMS	Chronic unpredictable mild stress

DAB	diaminobenzidina
GL	capa glomerular
Gr	capa granular
HIPO	hipotálamo
HVM	hipotálamo ventromedial
LOTd	tracto lateral olfativo, parte dorsal
Me	amígdala medial
Mit	capa mitral
Opt	tracto óptico
OVN	órgano vomeronasal
Ox	quíasma óptico
P	progesterona
PBS	solución amortiguadora de fosfatos
Pir	corteza piriforme
SE	sexualmente expertas
SES	sin experiencia sexual
SF	suprafisiológicas
SI	sexualmente inexpertas
SP	capa subependimaria.
ZI	zona intermedia
ZV	zona ventral

2. Abstract

Sexually naïve female mice do not show high sexual receptivity evaluated by the lordosis quotient, until they experience 4-5 sexual encounters. The neuronal changes induced by sexual experience are not entirely understood. In this study, we evaluated if repeated sexual stimulation with the same male is associated with an increase in the neuronal activity (c-Fos), and the expression of synaptophysin in the olfactory bulb (OB), ventromedial hypothalamus (VMH), or the medial preoptic area (MPOA). Ovariectomized and hormonally replaced female mice were distributed into three groups: sexually naïve (SN), with no prior sexual stimulation; sexually inexperienced (SI), with one prior mating session; and sexually experienced (SE), with six previous mating sessions. In the 7th week, each group was split into three subgroups: clean (exposure to clean bedding), male bedding (exposure to sawdust soiled with secretions from a male), or mating. Our c-Fos expression studies demonstrate that: 1) SE females show an increased c-Fos activation in the VMH when they mated, compared to SE females exposed to clean bedding; 2) SI females that mated had a lower response in the glomerular layer of the accessory OB (AOB) compared to SI exposed to male bedding; 3) SE females exposed to male bedding show a decrease response in the mitral layer of the AOB, compared to SI that mated; 4) SI females exposed to male bedding have a decreased response, compared with SN and SE females exposed to male bedding; 5) the lordosis quotient correlates with the number of c-Fos positive cells in the mitral layer of the AOB of SE and SI females. Synaptophysin expression data demonstrate differences in the BOA. In general terms, synaptophysin expression shows basal levels in the SN females, but it is reduced in the SI females, and increases in the SE females surpassing

the basal levels. These changes in the activation and expression in the BOA suggest an important role of the remodeling of this structure in the female sexual behavior, in which sexual hormones and sexual stimulation are involved.

3. Resumen

Las hembras de ratón no presentan alta receptividad sexual evaluada por el cociente de lordosis, hasta experimentar 4-5 encuentros sexuales. Los cambios neuronales inducidos por la experiencia sexual no se conocen completamente. En este estudio, evaluamos si la estimulación sexual reiterada con el mismo macho se asocia con la actividad neuronal (c-Fos), y la expresión de la proteína sinaptofisina en el bulbo olfatorio (BO), el hipotálamo ventromedial (HVM), o el área preóptica medial (APM). Ratones hembra ovariectomizadas y suplementadas con hormonas fueron asignadas a tres grupos: sin experiencia sexual previa (SES); sexualmente inexpertas (SI), con una sola sesión previa de cópula; y sexualmente expertas (SE), con seis sesiones previas de cópula. En la semana 7, cada grupo fue dividido en tres subgrupos: limpio (expuesto a aserrín limpio), aserrín de macho (expuesto a aserrín procedente de la caja de un macho) o cópula. En lo referente a nuestros datos de activación neuronal (c-Fos) encontramos: 1) Las hembras SE presentan un incremento en la expresión de c-Fos en el HVM cuando copulan comparado con las hembras SE expuestas a aserrín limpio; 2) Las hembras SI que copularon tienen una respuesta menor en la capa glomerular del BO accesorio (BOA) comparado con las hembras SI expuestas a aserrín de macho; 3) Las hembras SI expuestas a aserrín de macho presentan un decremento en la capa mitral del BOA comparado con aquellas SI que copularon; 4) Hembras SI expuestas a aserrín de macho

muestran un decremento en la capa mitral, en comparación a hembras SES y SE; 5) El cociente de lordosis de la última sesión de cópula correlaciona positivamente con el número de células positivas a c-Fos en la capa mitral en los grupos SE y SI. Nuestros datos referentes a la expresión de sinaptofisina demuestran que, en el BOA la sinaptofisina se expresa basalmente en las hembras SES, decrece en las hembras SI, e incrementa en las SE sobrepasando los niveles basales. Estos cambios en la activación y expresión de sinaptofisina en el BOA sugieren un papel importante de la remodelación de esta estructura en respuesta a la experiencia sexual, en el cual las hormonas y estimulación sexual se encuentran implicados.

4. **Antecedentes**

La reproducción sexual requiere de la interacción con otros conespecíficos para la generación de descendencia. Esta condición inherente a la reproducción sexual implica que todo organismo debe encontrar al menos un conespecífico de sexo opuesto y que dicho encuentro sexual ocurra en un momento propicio para la reproducción. Por esto la selección natural favoreció aquellos sujetos capaces de identificar, en otros organismos de su misma especie, su sexo y momento óptimo de reproducción. Esta información permite al organismo maximizar su eficacia reproductiva al detectar y evitar la interacción sexual en circunstancias de nula o poca probabilidad de éxito reproductivo (Wyatt 2017).

Esta comunicación entre los diferentes sexos para identificar a posibles parejas reproductivas, y su estado físico, ha llevado a una gran diversidad biológica con múltiples estrategias y formas. Una de estas estrategias, probablemente la más antigua dada su

conservación a lo largo de la filogenia (Dulac & Torello 2003), es el uso de sustancias químicas excretadas por un organismo y que el organismo expuesto a dichas sustancias presente receptores específicos (Ache & Young 2005). En el caso de los roedores dichos mecanismos evolucionaron y la detección de estas sustancias, clasificadas como feromonas, se realiza en el sistema olfativo principal y accesorio (Ache & Young 2005, Dulac & Torello 2003, Su et al 2009, Wyatt 2017).

4.1. *Conducta sexual*

En los roedores el sentido del olfato es indispensable para encontrar individuos de su misma especie que puedan ser potenciales parejas reproductoras. Es por lo que, tanto machos como hembras, liberan señales químicas (feromonas) que indican su género, estado hormonal, jerarquía social, estado de salud, etc. (Dulac & Torello 2003, Wyatt 2017). Las feromonas también pueden alterar rápidamente la fisiología y conducta del animal receptor, pues solo dos relevos sinápticos separan las neuronas sensoriales (en el epitelio olfativo y en el epitelio vomeronasal) de los centros implicados en la ejecución de la conducta sexual (Dulac & Torello 2003, Stowers & Liberles 2016). Las feromonas modifican el comportamiento del animal en respuesta a la información obtenida y a su estado fisiológico (Lanuza et al 2014, Martin-Sanchez et al 2015, Moncho-Bogani et al 2005, Stowers & Liberles 2016, Takacs et al 2017). Algunos de los efectos más conocidos de las feromonas sobre la fisiología de otros individuos son el efecto Vanderbergh, el cual consiste en el adelanto de la pubertad (Vandenbergh et al 1975); el efecto Bruce, consistente en la terminación de la gestación cuando la hembra es expuesta a las

feromonas de un macho con el cual no copuló (Bruce 1959); y efectos Lee-bot y Whitten los cuales modulan la duración del ciclo estral (prolonga y acorta, respectivamente) (Novotny et al 1980). De esta forma, las feromonas juegan un papel muy importante en la reproducción y conducta sexual.

La conducta sexual se considera innata ya que la mayoría de los individuos al alcanzar la madurez sexual la despliegan. Sin embargo, aun siendo un comportamiento innato, se muestra susceptible a cambios, siendo la experiencia sexual un factor muy importante que conlleva a una realización más eficientemente de esta conducta (Dewsbury 1969, Novotny et al 1980), ya que en sujetos con experiencia sexual esta conducta es más difícil de erradicar. De esta forma, se ha demostrado que las lesiones en las regiones neuronales que modulan la conducta sexual tienen efectos menos severos en animales sexualmente expertos que en inexpertos (Been & Petrulis 2010, Keller et al 2006a, Keller et al 2006b, Meredith & O'Connell 1979, Pfeiffer & Johnston 1994). Por lo que se ha sugerido que la experiencia sexual debe inducir cambios plásticos a nivel del sistema nervioso central.

El ratón hembra representa un buen modelo para estudiar los cambios plásticos inducidos por la experiencia sexual. La principal razón de ello es que presenta un comportamiento que cambia con la experiencia, pues en su primera cópula no despliega receptividad sexual en respuesta a la monta del macho. Se requieren de al menos cinco experiencias sexuales para que las hembras desplieguen altos niveles de receptividad (Bakker et al 2002, Bonthuis et al 2011, Mani et al 2000). Otra razón importante es que la receptividad es fácilmente observable por el reflejo de lordosis (dorsiflexión de la

espalda que expone los genitales y facilita la penetración) (Pfaff & Lewis 1974) y es también sencillamente cuantificable haciendo uso del cociente de lordosis (CL), el cual se define como el número de lordosis efectuadas por la hembra dividido por el número de montas realizadas por el macho. Dado este aumento en la receptividad sexual producido por la experiencia sexual, sería de esperar que éste cambio en la conducta presente un correlato con alguna modificación en el sustrato neuronal.

Se ha demostrado que en la rata macho sexualmente experta, pero no en los animales sin experiencia, las feromonas de las hembras receptivas incrementan la actividad celular evaluada por la expresión del gen de respuesta temprana c-Fos (Kashiwayanagi 2014), aumento también observado en hembras expertas expuestas a feromonas de macho (Bonthuis et al 2011). Por lo que se propone que la experiencia sexual puede inducir cambios en la función neuronal. Otros cambios cerebrales en respuesta a la experiencia sexual han sido reportados por Bharadwaj y colaboradores (Bharadwaj et al 2013), quienes estudiando ratones macho híbridos (cepa B6D2F1, cruce entre hembras C57BL/6J y machos DBA/2J), encontraron que aproximadamente el 30% continúan copulando después de la gonadectomía. Estos machos castrados copuladores mostraron alta expresión del péptido precursor de amiloides y la proteína asociada a microtúbulo Tau en el área preóptica medial (APM) en comparación a los machos que dejan de copular después de la gonadectomía, así como también una expresión más elevada de sinaptofisina y espinofilina (una fosfatasa con alta expresión en espinas dendríticas, implicada en la formación de estas por mecanismos aún no conocidos al detalle) (Allen et al 1997, Bharadwaj et al 2013).

En el caso de los roedores, el bulbo olfatorio (BO) tiene un papel importante en la conducta sexual, especialmente en la aproximación hacia el sexo opuesto y en particular una función relevante en los primeros encuentros sexuales y en la adquisición de experiencia sexual. La relación del BO en la conducta sexual queda evidenciada por sus proyecciones a centros de regulación de la conducta sexual, siendo destacable sus conexiones directas con la amígdala (AMG) y el núcleo de la cama de la estría terminal en el caso del BO accesorio (BOA), y el relevo de estas áreas hacia otras estructuras hipotalámicas como el APM y el hipotálamo ventromedial (HVM). Este papel iniciador en la conducta sexual, hace del BO una importante estructura merecedora de estudios anatómicos y funcionales para comprender su papel en la conducta sexual del individuo.

4.2. *Bulbo olfatorio*

El BO tiene una estructura fácilmente distinguible del resto del cerebro. En roedores, y en la mayoría de los mamíferos, ocupa la posición más rostral del cerebro. Se pueden distinguir tanto funcional como estructuralmente dos partes: El bulbo olfatorio principal (BOP) y el BOA. Ambos tienen una estructura típica de tres capas, las cuales son la granular, la mitral y la glomerular.

La distinción entre el BOP y el BOA, se debe a que el BOP recibe proyecciones de las neuronas del epitelio olfativo y el BOA las recibe del órgano vomeronasal. El epitelio olfativo detecta sustancias volátiles y el órgano vomeronasal sustancias volátiles y no volátiles (Martinez-Garcia et al 2009). En la mayoría de los mamíferos la olfacción juega un papel muy importante en la comunicación, pues a través de esta los animales pueden recibir información de conspecíficos (identidad, estado de salud, estado hormonal,

disponibilidad sexual, etc). La información de conoespecíficos se recibe a partir de secreciones o excreciones de las feromonas, y éstas son capaces de alterar la fisiología y/o conducta del animal que las detecta (Karlson & Luscher 1959).

EL BO no sólo es la primera línea de relevo de la información quimiosensorial; además se encuentra ampliamente relacionado con otras estructuras implicadas en el comportamiento de tipo socio-sexual. Una característica que hace particular al sentido del olfato es que la vía del epitelio olfatorio va al BOP y de ahí pasa directo a la corteza olfativa, sin hacer relevo en el tálamo como ocurre con el resto de los cinco sentidos clásicos. La vomero-olfacción también presenta la vía directa del órgano vomeronasal al BOA y de éste a su equivalente corteza vomeronasal (el núcleo cortical posteriomedial de la AMG) (Gutierrez-Castellanos et al 2014). Estas formas tan directas de la transmisión de la información permiten cambios en el estado hormonal y conductual de un animal con base a la detección de feromonas (Huilgol & Tole 2016).

Otra interesante particularidad del BO es su constante recambio neuronal a lo largo de toda la vida adulta, gracias a la neurogénesis. Esta ocurre debido a que algunos mecanismos implicados de la morfogénesis, durante las etapas embrionarias se mantienen a lo largo de toda la vida del animal. Estas nuevas neuronas parecen estar relacionadas con mecanismos de aprendizaje y memoria olfativa, pues el enriquecimiento olfativo aumenta la supervivencia de estas (Lledo & Valley 2016).

4.2.1 Ontogenia

A) Desarrollo temprano

En vertebrados, todas las neuronas periféricas sensoriales se desarrollan a partir de dos regiones del ectodermo: las placodas craneales y la cresta neural. Las placodas se forman a partir de ectodermo condensado, localizado en la región que dará lugar a la cabeza (Schlosser 2006).

La cresta neural es una estructura transitoria que se genera durante las primeras fases de la embriogénesis, en la unión entre el neuroepitelio y la epidermis (Le Douarin & Kalcheim 1999). Las células que forman esta estructura migran y se diferencian en diversos tipos celulares, incluyendo neuronas y glías del sistema nervioso periférico, cartílago del cráneo, células de la glándula adrenal y melanocitos (Acloque et al 2009, Bronner-Fraser 1995, Le Douarin & Kalcheim 1999).

B) Desarrollo general del BO

En la parte más rostral de la cresta neural se forman las placodas craneales. Dos de estas son placodas olfativas, y son claramente distinguibles a los 9.5 días del desarrollo embrionario (E9.5), y dan lugar a tanto la parte neural como la no-neural de la nariz (Maier et al 2014, Schlosser 2006). Se pensaba que la placoda olfativa se formaba a partir de células de regiones adyacentes a la pre-placoda (Bhattacharyya & Bronner-Fraser 2004, Couly & Le Douarin 1985, Forni & Wray 2012), pero estudios recientes han demostrado una implicación de múltiples células, incluidas entre ellas células de la

cresta neural (Whitfield 2013, Whitlock & Westerfield 2000). Estas células derivadas de la cresta neural se encuentran implicadas en el desarrollo de la parte frontal de la nariz, incluyendo el epitelio olfativo (Osumi-Yamashita et al 1994, Osumi-Yamashita et al 1997).

La placoda olfativa es la estructura precursora del epitelio olfativo y el órgano vomeronasal (Treloar et al 2010). Esta estructura se invagina formando un “foso” alrededor del día E10.5. Simultáneamente a la invaginación, las células de la placoda olfativa se dividen engrosando el epitelio. Esta fosa aumenta en complejidad haciendo distinguible una cavidad nasal y los orificios nasales alrededor del día E11 (Chen et al 2009, Cuschieri & Bannister 1975a, Cuschieri & Bannister 1975b, Forni & Wray 2012). El órgano vomeronasal se forma en la parte media de la cavidad nasal también alrededor del día E11, y al llegar al día E11.5 ya se aprecian tanto la cavidad olfatoria principal como la accesoria (Treloar et al 2010).

Durante el día E11.5 la mayoría de las células del epitelio olfatorio siguen siendo proliferativas, pero alrededor del día E12.5 el epitelio olfatorio empieza a organizarse en su estructura pseudoestratificada característica, y solamente las células basales se mantienen como estrato germinativo del epitelio olfatorio, estas células darán lugar a todos los recambios de neuronas sensoriales olfativas que se darán a lo largo de toda la vida del animal (Beites et al 2005, Ikeda et al 2007, Suzuki & Osumi 2015, Valverde & Lopez-Mascaraque 1991).

C) Origen y migración de las células del BO

La morfogénesis del BOP se lleva a cabo en dos pasos. Las neuronas de proyección se originan primero, en la zona ventral, en la parte rostral del telencéfalo. De ahí migran rostralmente para formar una pequeña protuberancia, el BOP primordial, entre los días E12 y E13 en ratón. Poco después en el día E14, las interneuronas (células granulares y periglomerulares) llegan al primordio (Bayer et al 1993). Una vez que las células han llegado a su destino, inicia la organización laminar donde las células granulares y periglomerulares ocupan sus capas, dando lugar a las características capas del BO (Nieto-Sampedro et al 2006).

El BOP recibe entrada sensorial de las neuronas sensoriales olfativas, en el epitelio olfatorio, vía el nervio olfativo. El axón de las neuronas sensoriales olfativas llega al BO y hace sinapsis con las células mitrales y empenachadas las cuales son las neuronas de proyección. Estas hacen sinapsis vía el tracto lateral olfativo hacia múltiples componentes de la corteza olfativa (Huilgol & Tole 2016) y componentes de la AMG (Cadiz-Moretti et al 2016). Aquellas neuronas que solo inervan localmente el BO y no proyectan a otras estructuras (como las células granulares y periglomerulares) se denominan interneuronas. Las neuronas de proyección y las interneuronas, no sólo tienen funciones distintas, además también tienen diferentes orígenes embrionarios (Anderson et al 1997, Kosaka & Kosaka 2016, Lledo & Valley 2016).

C.1) Neuronas de proyección del BOP

Las células mitrales y empenachadas derivan de células progenitoras de palio de la región local de la zona ventricular del BOP (Imamura et al 2011), su migración sigue un

patrón de dentro a fuera, dejando las neuronas recientes en el interior, mientras las más tardías se establecen en lugares más superficiales (Bulfone et al 1998).

Comparándolo con la neocorteza, donde la glía tiene distribución radial en paralelo, en el BOP la glía radial tiene morfología arborizada y entrelazada, aunque la función para dicha organización es aún poco clara (Puche & Shipley 2001). Además, las células mitrales y empenachas nuevas presentan tanto migración radial como tangencial, para alcanzar su destino en la capa mitral.

C.2) Interneuronas del BOP

Las interneuronas del BOP se originan en subpalio y toman una ruta tangencial de migración hasta alcanzar su destino en las capas del BO (Anderson et al 1997, Nobrega-Pereira & Marin 2009, Wichterle et al 2001). Estas surgen del segmento dorsal de la eminencia gangliónica lateral (Stenman et al 2003), y del septum (Long et al 2003). Las células progenitoras de estas interneuronas migran rostral y tangencialmente en el BOP. Una parte de esta migración desde la eminencia ganglionica lateral continua durante la edad adulta, siendo conocida como la vía de migración rostral (Kriegstein & Alvarez-Buylla 2009).

C.3) Particularidades del BOA

Otro sistema quimiosensorial de los roedores, así como muchos otros mamíferos (no presente en humanos), es categorizado como secundario o accesorio. El órgano sensorial de este sistema es el órgano vomeronasal, y este consiste en un par de cilindros con cavidad, parcialmente alineados por un epitelio pseudoestratificado de neuronas

sensoriales vomeronasales. Al ser unas cavidades ciegas no permiten la corriente de aire por respiración (a diferencia del epitelio olfatorio, ampliamente expuesto a la corriente de aire respiratorio), esto impide que con solo la respiración puedan llegar partículas al órgano vomeronasal (como ocurren en el epitelio olfatorio). Para que el aire y las partículas lleguen a los receptores de las neuronas sensoriales vomeronasales en el órgano vomeronasal se requiere de un mecanismo fisiológico para permitir la entrada de aire en estas cavidades. En ratones se consigue con un bombeo vomeronasal controlado por el sistema nervioso simpático (Meredith & O'Connell 1979). La posición del órgano vomeronasal más cercana al exterior, junto con la necesidad de un sistema activo de bombeo, sugiere que este órgano está más especializado en la detección de sustancias no volátiles (aunque no descarte la detección de volátiles), siendo esta hipótesis corroborada por la presencia de receptores a proteínas y grandes moléculas orgánicas en las neuronas sensoriales vomeronasales (Brignall & Cloutier 2015). Estas características del sistema hacen del órgano vomeronasal un sistema quimiosensorial de cortas distancias (Keller et al 2006a, Luo et al 2002, Moncho-Bogani et al 2002, Moncho-Bogani et al 2004, Pankevich et al 2004).

En los roedores, el BOA se localiza dorsal al BOP, y es el primer relevo entre el órgano vomeronasal y el resto del cerebro. EL órgano vomeronasal proyecta al BOA de una forma ordenada, siendo las neuronas de la parte apical la que proyecta a la parte anterior del BOA (BOAa) y la parte basal la que proyecta a la parte posterior (BOAp) (Del Punta et al 2002, Wagner et al 2006) (Fig. 1).

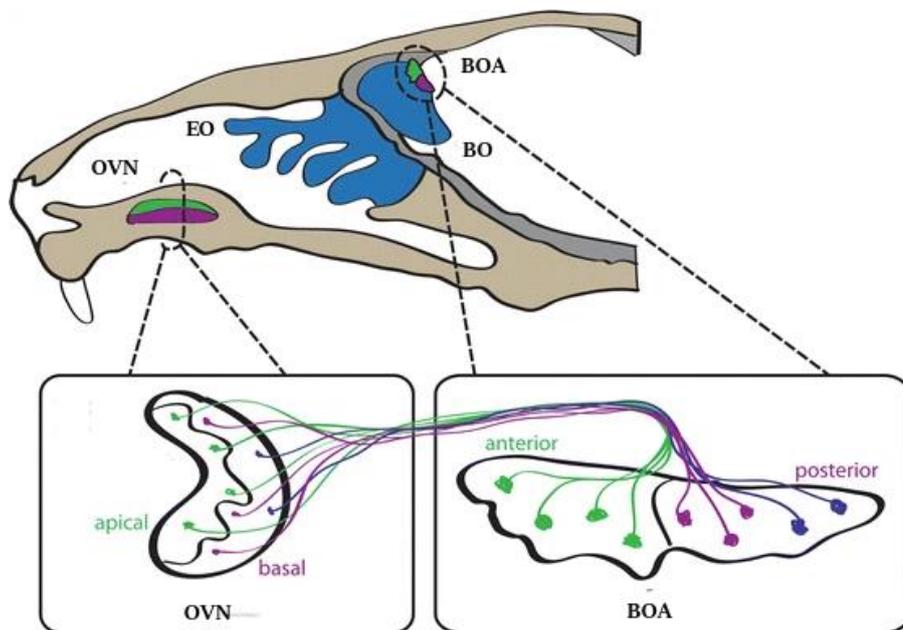


Figura 1. Circuito del sistema vomeronasal de ratón. El Sistema vomeronasal se conforma del órgano vomeronasal (OVN) y el BOA. EL OVN se sitúa en la parte basal del septo nasal y contiene las neuronas sensoriales vomeronasales, las cuales expresan los receptores químicos. Las neuronas sensoriales vomeronasales proyectan sus axones al BOA, localizado dorsocaudalmente al bulbo olfatorio. EL neuroepitelio del OVN se divide en la región apical (verde), y la basal (morado). EL BOA también se subdivide en dos regiones: la anterior (verde) y la posterior (morado). Las neuronas sensoriales vomeronasales que tienen su soma en la región apical del OVN proyectan sus axones a la parte anterior del BOA. En cambio, las neuronas sensoriales vomeronasales con su soma en la parte basal del OVN proyectan la parte posterior del BOA. Modificado de (Brignall & Cloutier 2015).

A su vez el BOAa y BOAp proyectan a diferentes áreas: el BOAa proyecta a la división medial de la parte posteromedial del núcleo base de la estría terminal y el BOAp proyecta a la AMG anterior dorsal, a la parte anterior ventral de la AMG medial (Me) y al núcleo base del tracto olfativo accesorio. Ambas partes del BOA proyectan de forma convergente a la parte más ventral de la AMG cortical anterior, la AMG anterior ventral y la Me, parte anteroventral (Mohedano-Moriano et al 2007).

Esta distinta inervación les confiere diferencias funcionales a sus partes, siendo el BOAa más relacionado con el comportamiento sexual, mientras que el BOAp se le relaciona

más con la detección de señales implicadas en conductas defensivas/agresivas (Halpern & Martinez-Marcos 2003).

Se asume que el BOA tiene mecanismos de desarrollo compartidos con el BOP, dado su proximidad y composición similar de las capas que los conforman (Meisami & Bhatnagar 1998, Sokolowski & Corbin 2012). No obstante, la disparidad observada entre las proyecciones hacia BOAa y el BOAp sugiere de algún mecanismo exclusivo de este (Brignall & Cloutier 2015).

Las principales diferencias de la parte anterior y posterior del BOA se encuentran en sus conexiones con neuronas sensoriales y neuronas de proyección. Por otro lado, las interneuronas son similares en ambas partes y también similares a las poblaciones de interneuronas presentes en el BOP (Oboti et al 2009, Peretto et al 2001).

D) Desarrollo embrionario y la organización multicapa del BO

Desde estadios muy tempranos del desarrollo embrionario se puede distinguir la zona ventricular en la parte más rostral del telencéfalo (primordio del BO). La zona ventricular es un estrato germinativo, y mediante la mitosis de sus células, da lugar a una capa superficial, conocida como zona intermedia, la cual está formada por neuroblastos postmitóticos. Posteriormente la zona intermedia se engrosa y se forma la vesícula telencefálica, donde se delimita la capa de los nervios olfativos. A continuación, aparece la capa subependimaria, entre la zona ventricular y la zona intermedia. En el día E14 ya se aprecian cinco capas en el bulbo: zona ventricular, capa subependimaria, la capa de

células mitrales, capa plexiforme externa y la capa de nervios olfativos. La reorganización de las capas conlleva a la intersección de la capa mitral en la plexiforme alrededor del día E15, resultando en la división de esta en capa plexiforme externa, superficial a la mitral, y a la capa plexiforme interna. Al día E17 ya se observa formada la capa glomerular justo entre la capa plexiforme externa y la capa de nervios olfativos (Fig. 2). A continuación, se describirán cada una de las capas del BO.

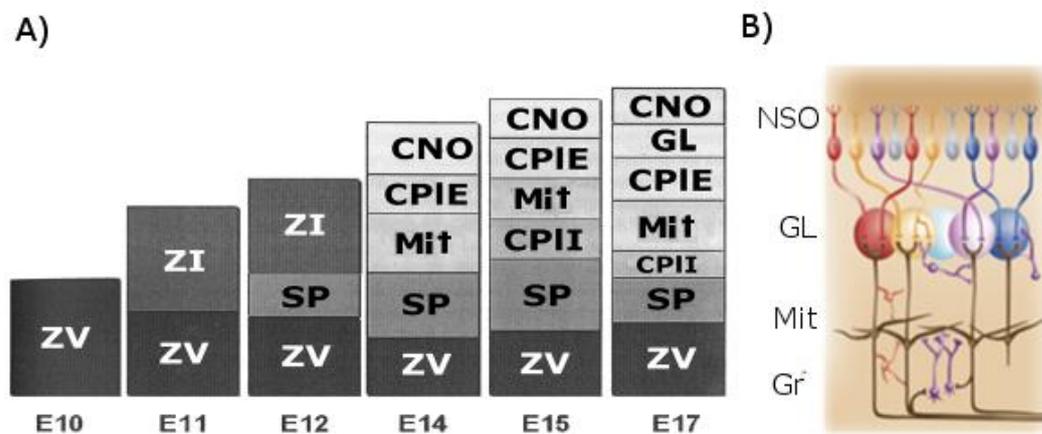


Figura 2. Desarrollo de las capas del BO. A) Esquema del desarrollo de las capas del BO de ratón en relación con la etapa embrionaria. B) Dibujo de las capas del BO, con la representación de las neuronas sensoriales olfativas (NSO). Mit: Capa de células mitrales, GL: Capa glomerular, Gr: capa granular, CNO: Capa de los nervios olfativos, CPIE Capa plexiforme externa, CPII: Capa plexiforme interna, NSO: neuronas sensoriales olfativas SP: Capa subependimaria, ZI: Zona intermedia, ZV: Zona ventral. Modificado de (Nieto-Sampedro et al. 2006).

Capa de los nervios olfativos: Es la capa más externa del BO, compuesta principalmente por los axones de las neuronas sensoriales olfativas en su entrada al BO, y también por células de la glía envolvente. Estas células gliales migran del epitelio al BO. Las neuronas sensoriales olfativas degeneran y son reemplazadas a lo largo de la vida del animal (Suzuki & Osumi 2015). Los axones de las neuronas nuevas crecen por todo el

mesénquima atravesando esta capa hasta llegar a la glomerular, donde inervan glomérulos específicos en función del receptor que expresen (Feinstein & Mombaerts 2004).

La capa glomerular: es donde se produce la sinapsis de los axones de las neuronas receptoras, la terminal dendrítica de las neuronas de proyección y las células de axón corto, dendritas y axones de las células periglomerulares, y las células empenachadas externas. Todas estas conexiones ocurren confinadas en una estructura esférica llamada glomérulo, de entre unos 50-100 μm de diámetro. Esta es la última capa en aparecer durante el desarrollo pues requiere la maduración de todos los tipos celulares que la componen y la reorganización en los característicos glomérulos. Durante el desarrollo se forman inicialmente los protoglomérulos, los cuales solo están formados por los axones olfativos que se insertan entre las dendritas de las células mitrales y empenachadas (Bailey et al 1999, Blanchart et al 2006, Treloar et al 2010, Treloar et al 1999). Posteriormente se incorporan las dendritas de las células de proyección dando lugar a la formación del glomérulo completo. El glomérulo presenta compartimentalización, siendo posible distinguir una zona axonal y una zona dendrítica. La capa axonal está formada prácticamente por los axones de las neuronas sensoriales olfativas y algunos procesos de las células periglomerulares, y la presencia de sinapsis axo-dendríticas. La zona dendrítica se caracteriza por contener prolongaciones dendríticas, presentándose contactos de tipo dendro-dendríticos (Kasowski et al 1999).

La capa plexiforme externa: su principal característica es la presencia de células empenachadas, que se organizan en externas, medias e internas (según su localización).

Estas células presentan una o más dendritas apicales gruesas, que ramifican en un extremo integrándose al glomérulo, y dendritas secundarias que se extienden por la capa plexiforme interna (Lopez-Mascaraque & de Castro 2002). Todas las células empenachadas internas y algunas medias proyectan su axón por la capa plexiforme interna y posteriormente al tracto lateral olfativo, y son junto con las células mitrales las únicas que proyectan fuera del BO. En el límite de esta capa con la capa mitral se encuentran algunas interneuronas de tipo células de Van Gehuchten, en mucho menor número, con 3 a 5 dendritas primarias con apariencia de axón y conectando con las dendritas secundarias de las células mitrales y empenachadas, a estas se le asume un papel inhibitorio (Nieto-Sampedro et al 2006, Oboti et al 2009).

La capa de las células mitrales: es donde se alojan las células mitrales, principales células de proyección del BO. Su nombre proviene del aspecto de su soma con forma de mitra. Su dendrita principal atraviesa la capa plexiforme externa hasta alcanzar los glomérulos, ahí hace sinapsis con los axones de las neuronas sensoriales olfativas.

La capa plexiforme interna: las dendritas secundarias de las células mitrales se extienden por la parte inferior de esta capa, siguiendo largos trayectos horizontales. El axón de las células mitrales desciende hasta esta capa y proyectan a la parte ventrolateral del telencéfalo formando el tracto lateral olfativo (Lopez-Mascaraque & de Castro 2002).

La capa granular: las neuronas características de esta capa son las células granulares, interneuronas GABAérgicas carentes de axón. Su dendrita apical establece sinapsis con otras dendritas secundarias de las células mitrales, y algunas de las empenachadas. Las células de Blanes; neurona de gran tamaño con morfología estrellada y con dendritas

llenas de espinas; aparece también en esta capa haciendo contactos axo-dendríticos GABAérgicos con las células granulares. Las células de Blanes se encuentran implicadas en la inhibición de las células granulares, y su disparo continuo puede provocar largos periodos de inhibición en las células granulares (Pressler & Strowbridge 2006).

La capa subependimaria: persiste a lo largo de la edad adulta a pesar de la obliteración del ventrículo olfativo. Esta capa cobra especial relevancia en la vía migratoria rostral, ya que representa el acceso de los neuroblastos de la zona ventricular, y la glía presente en esta capa aporta el soporte para la migración de las células a través del BO.

E) Formación del glomérulo

La información sensorial olfatoria detectada por las neuronas sensoriales olfativas, es procesada en los glomérulos del BO. Las neuronas sensoriales olfativas presentan proyecciones axónicas glutamatérgicas (Berkowicz et al 1994) generalmente a dos glomérulos, y cada uno recibe axones de neuronas sensoriales olfativas con la expresión de un receptor olfativo en común (Imai 2014).

Un glomérulo típico se encuentra invadido por las dendritas primarias de células mitrales o empenachadas (Murphy et al 2005, Sosulski et al 2011). Estas neuronas extienden una sola dendrita apical hacia un único glomérulo, presentando ramificaciones en el interior del glomérulo (Fig. 2). También proyectan una larga dendrita lateral por la capa plexiforme externa, donde contactan con las interneuronas GABAérgicas (Imai 2014). Generalmente las neuronas periglomerulares inervan un único glomérulo. Estas se activan por la señal de las neuronas sensoriales olfativas, neuronas mitrales y empenachadas; produciendo entonces una inhibición GABAérgica retroactiva

a todas estas neuronas y las periglomerulares vecinas (Aroniadou-Anderjaska et al 2000, Hsia et al 1999, Murphy et al 2005).

Los mecanismos de proyección específica de las neuronas sensoriales olfativas a las neuronas mitrales y empenachadas de sus correspondientes glomérulos son aún poco conocidos. Se ha propuesto que debe haber cierta determinación genética, y mecanismos moleculares que median la guía y conexión axonal de las neuronas sensoriales olfativas hacia el glomérulo. Estos axones de las neuronas sensoriales olfativas parecen tener un papel organizador en la formación del glomérulo, pues este no se genera en su ausencia (Couper Leo & Brunjes 2003, Kobayakawa et al 2007). Por su parte las neuronas mitrales y empenachadas en su inicio presentan diversas dendritas innervando a más de un glomérulo, pero estas se reducen a solo una dendrita innervando un único glomérulo en la primera semana postnatal (Lin et al 2000, Matsutani & Yamamoto 2000). Esta maduración postnatal del circuito se encuentra modulada por la actividad de las neuronas sensoriales olfativas (Angelo & Margrie 2011, Maher et al 2009).

Las neuronas mitrales y empenachadas se encuentran asociadas en un mismo glomérulo. Sus dendritas primarias se encuentran eléctricamente pareadas debido a uniones GAP y a sitios de liberación de glutamato (Christie et al 2005, Hayar et al 2005, Schoppa & Westbrook 2001). No obstante, los somas de este par asociado de neuronas se encuentran entremezclados con otras neuronas, y sus patrones de dendritas laterales difieren (Ke et al 2013). Estas características diferenciales sugieren independencia en el procesamiento de la información olfativa. Las neuronas mitrales suelen recibir un mayor

número de entradas inhibitorias de las células granulares (Nagayama et al 2004). Las neuronas empenachadas suelen activarse con una concentración menor de odorante y suelen mostrar una menor latencia de respuesta (Fukunaga et al 2012, Gire et al 2012, Igarashi et al 2012). Las células empenachadas reciben la señal directamente de las neuronas sensoriales olfativas, mientras que la mayoría de las mitrales suelen recibirla de forma indirecta a través de las empenachadas. Por esta razón las neuronas mitrales reciben información más procesada que las empenachadas (Imai 2014).

4.2.2 Conexiones del BO y su función

A) *Del epitelio olfatorio al BOP*

El epitelio olfatorio es pseudoestratificado compuesto por tres tipos de células: células de soporte, células basales y neuronas receptoras (Maier et al 2014).

Las células de soporte ayudan a la retirada de sustancias de la superficie y se ha propuesto que pueden tener un papel en la formación de la capa externa de moco. Las células basales entran periódicamente en división, y sus células hijas se diferencian y reemplazan a las neuronas receptoras que entran en apoptosis. Las neuronas receptoras tienen unas dendritas que llegan a la superficie apical del epitelio olfatorio donde exponen sus cilios, los cuales expresan receptores olfativos; y su axón llega hasta el BOP (Murdoch & Roskams 2007). La llegada al BOP de estos axones es de forma ordenada, cada uno de los glomérulos procesa una o unas pocas señales provenientes de las neuronas sensoriales (que rara vez expresan más de un tipo de receptor olfativo) (Brignall & Cloutier 2015). Aunque no se llegue al grado tan topológico e identificable como la organización del mapa retinotópico en la corteza visual, las conexiones de las

neuronas sensoriales llegan a glomérulos específicos dependiendo del tipo de receptores que expresen (Mombaerts et al 1996).

B) *Del órgano vomeronasal al BOA*

El epitelio del órgano vomeronasal (que se encuentra en el interior de la cavidad cilíndrica) también presenta una estructura pseudoestratificada igual a la del epitelio olfatorio, sólo que sus neuronas sensoriales carecen de cilios sensoriales, y en su lugar tienen microvellosidades (Halpern & Martínez-Marcos 2003). Estas neuronas también proyectan sus axones hasta el BO, solo que estos llegan a la capa mitral del BOA.

C) *Conexión del BO con estructuras sexualmente relevantes*

El BO juega un papel importante en la conducta sexual, como ya hemos visto por ser la primera línea de codificación de señales feromonales de tipo sexual. No obstante, para la expresión de la conducta sexual se requiere del reclutamiento de otras estructuras cerebrales. Las áreas del cerebro implicadas en la conducta sexual forman parte del sistema límbico (Sokolowski & Corbin 2012). El sistema límbico del roedor se compone principalmente de la AMG, el núcleo de la cama de la estría terminal, el hipotálamo, el hipocampo, el núcleo accumbens, el área tegmental ventral, la sustancia gris periacueductal. La principal entrada a este sistema por parte del BOA y BOP es la AMG, donde las proyecciones de ambos convergen (Mohedano-Moriano et al 2007, Sokolowski & Corbin 2012) (Fig. 3).

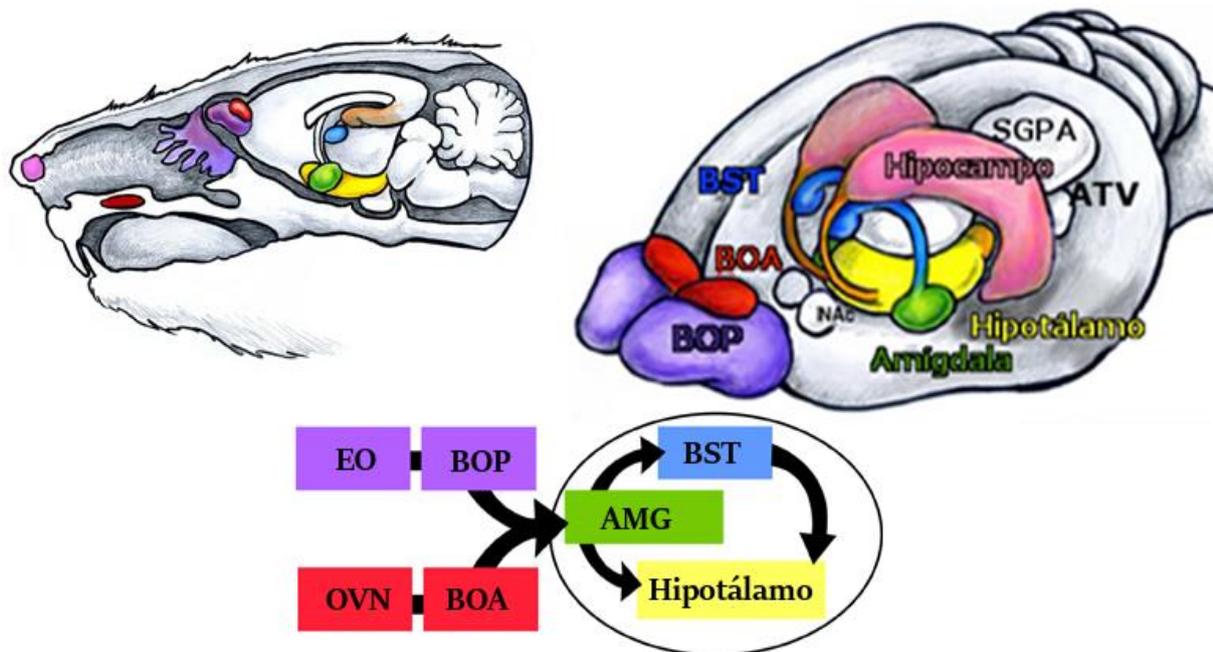


Figura 3. Sistema límbico de ratón y la entrada de información olfativa. A) Corte sagital de la cabeza de ratón, dónde se aprecia la posición del epitelio olfatorio (EO) y el órgano vomeronasal (OVN). B) Encéfalo de ratón con las estructuras pertenecientes al sistema límbico. C) Representación del flujo de información desde el epitelio olfatorio y el órgano vomeronasal. En roedores el sistema límbico se encuentra altamente influenciado por las señales olfativas recibidas por el epitelio olfatorio (morado), y el órgano vomeronasal (rojo). Las proyecciones del órgano vomeronasal y el epitelio olfatorio llegan a BOA y BOP respectivamente. La señal recibida pasa de estos a otras estructuras del sistema límbico, incluyendo la amígdala (AMG, verde), el núcleo base de la estría terminal (BST, azul) y el hipotálamo (amarillo). Modificado de (Sokolowski & Corbin 2012).

C.1) Circuito cerebral de la conducta sexual

La conducta sexual en mamíferos generalmente consiste en dos fases: la inicial apetitiva, seguida de la consumatoria. En machos la fase apetitiva incluye investigación anogenital, u olfateo de la hembra. La detección de feromonas por el órgano vomeronasal y el epitelio olfatorio genera la estimulación de sus correspondientes áreas del bulbo (BOP y BOA), que a su vez proyectan de forma directa a la parte anterior de la Me (Kang et al

2011, Meurisse et al 2009). La Me actúa como nodo central que inerva otras regiones cerebrales. Desde la Me la señal viaja hasta el núcleo de la cama de la estría terminal, el AMP, la porción ventrolateral del HVM y al núcleo premamilar ventral del hipotálamo (Emery & Sachs 1976). La señal continúa su curso del APM hacia el área tegmental ventral y al núcleo accumbens, al llegar a estas estructuras puede iniciarse las conductas apetitivas como el olfateo. La misma vía (órgano vomeronasal-BOA-AMG-núcleo de la cama de la estría terminal-APM) controla también el comportamiento consumatorio, tales como la monta, la intromisión y la eyaculación, solo que para estos comportamientos se requiere de las aferencias que llegan a la porción ventrolateral del HVM, la sustancia gris periacueductal, el núcleo paragiganta y a el núcleo lumbosacral de la espina dorsal (Kozyrev & Coolen 2015, Kozyrev & Coolen 2017, Ventura-Aquino & Paredes 2020).

En el comportamiento apetitivo y consumatorio de las hembras se activa el mismo circuito olfativo-amigdalino, pero con la diferencia de que en los machos tanto el comportamiento apetitivo como el consumatorio son regulados principalmente por el APM (Been & Petrulis 2010). En las hembras el APM sólo se encuentra implicado en los comportamientos apetitivos, como el orejeo y persecución, el papel regulador sobre las conductas consumatorias recae en la porción ventrolateral del HVM (Ventura-Aquino & Paredes 2020). La lesión de esta área hipotalámica conlleva la reducción del comportamiento de lordosis, mientras que su estimulación eléctrica lleva a la expresión de esta conducta incluso en ausencia de macho (Pfaff & Sakuma 1979a, Pfaff & Sakuma 1979b).

La lordosis, también depende de las proyecciones que relevan a la sustancia gris periacueductal, el núcleo paragiganta y el núcleo lumbosacral de la espina dorsal (Lonstein et al 1998).

C.2) Hipótesis dual

Ya hemos mencionado en apartados anteriores que epitelio olfatorio y órgano vomeronasal proyectan a BOP y BOA respectivamente. A su vez, BOP y BOA presentan proyecciones separadas, pudiendo distinguir dos sistemas distintos (Fig. 4).

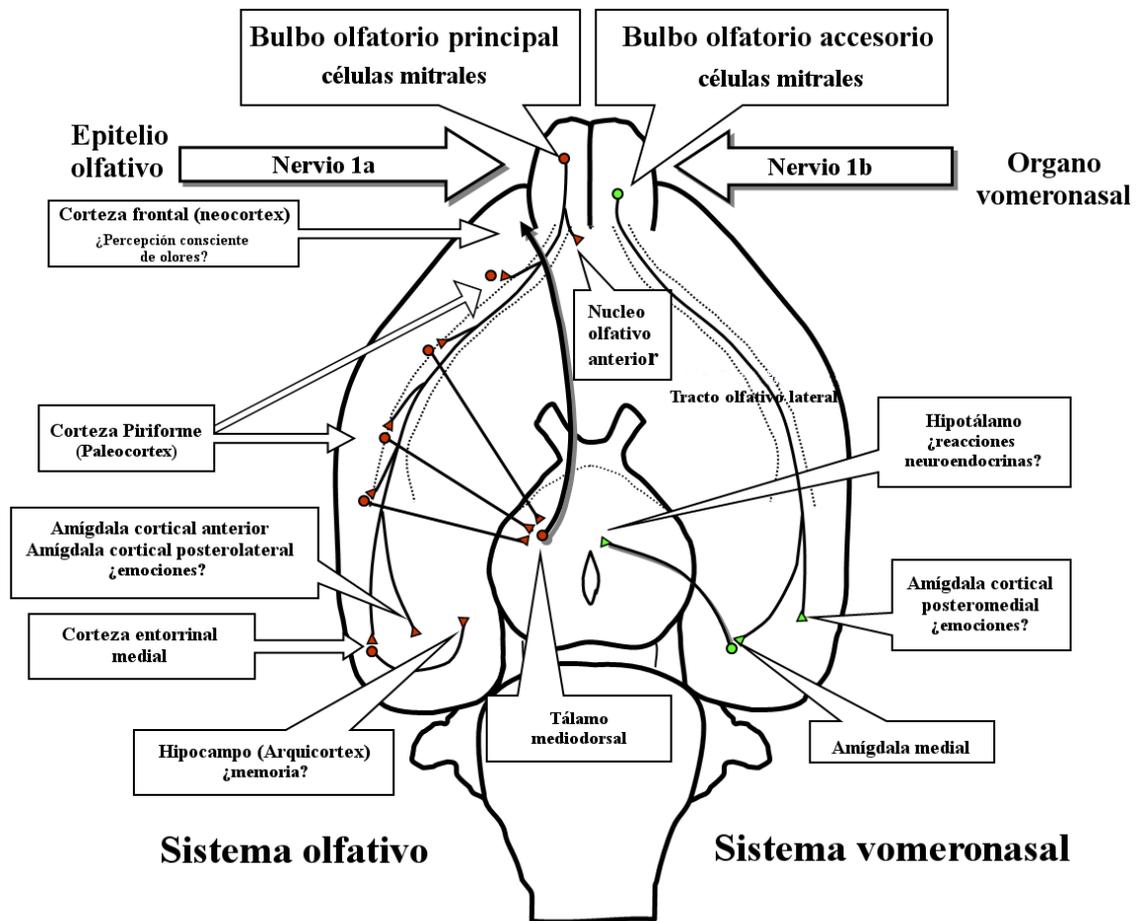


Figura 4. Representación ventral del encéfalo de ratón, en el cual se representa la vía olfativa (izquierda) y la vía vomeronasal (derecha). Se indican las áreas de proyección y algunas de las funciones atribuidas a estas. Modificado de (Nieto-Sampedro et al. 2006).

En la conducta sexual el BOA y el BOP presentan convergencia y cierta función complementaria.

No obstante, dichos patrones de conexión diferenciales llevaron a la conclusión de que cada sistema tiene una función fisiológica distinta. Lo que llevó a una hipótesis dualista en la que se le atribuía al sistema vomeronasal las funciones de detección de feromonas y por consecuencia los cambios fisiológicos y la ejecución de los comportamientos innatos estereotipados derivadas de su detección. Mientras que al sistema olfativo principal se le atribuía la detección de sustancias no feromonales, en las que implicarían mecanismos de aprendizaje y memoria (Fortes-Marco et al 2013).

Estas ideas provienen de experimentos clásicos como los realizados por Powers y Winans en 1973. Estos realizaron una serie de experimentos en machos hámster, que implicaban la lesión temporal y restringida del epitelio olfatorio con sulfato de zinc y ablaciones completas del BO. Con estas herramientas, descubrieron que la lesión del epitelio olfatorio resultaba en anosmia del animal, pero no afectaba a la conducta sexual de machos con o sin experiencia sexual previa. En cambio, la lesión completa del BO conllevaba la pérdida total de la conducta sexual. Estas observaciones los llevaron a concluir que los estímulos olfatorios, detectados por el epitelio olfatorio, no eran necesarios y a proponer que el control y regulación de la conducta sexual recaen en el BOA, ya que el órgano vomeronasal no resultaba dañado en sus lesiones con sulfato de zinc (Powers & Winans 1973).

Experimentos más recientes han contribuido a hacer más borrosa esta distinción dualista donde el órgano vomeronasal detecta feromonas y el epitelio olfatorio procesa

otro tipo de odorantes. Se ha demostrado que la destrucción del epitelio olfatorio en hembras de ratón reduce significativamente la receptividad sexual (Keller et al 2006a) y que el órgano vomeronasal se requiere para desplegar la respuesta de lordosis en hembras de ratón, pero su lesión no impide la discriminación de sexos por parte del animal lesionado (Keller et al 2006b).

Además de la mencionada convergencia anatómica de ambos sistemas, parecen tener también una convergencia funcional que dificulta en algunos casos la determinación del peso de cada uno de los sistemas en la conducta sexual. Este problema deriva de que puede generarse aprendizaje de tipo asociativo entre un olor (detectado por el epitelio olfatorio) y una feromona (detectada por el órgano vomeronasal). Esta asociación conlleva que el odorante detectado por el epitelio olfatorio pueda adquirir el papel funcional de la feromona inicial (Lanuza et al 2014).

4.2.3 El BO, una estructura plástica

El BO representa una compleja paradoja en la evolución del cerebro: siendo una de las estructuras cerebrales más conservada a lo largo de la evolución (Nieto-Sampedro et al 2006). El BO está implicado en respuestas conductuales estereotipadas e innatas a estímulos odorantes, pero a su vez también en respuestas conductuales a estímulos odorantes adquiridas con la experiencia (Lanuza et al 2014). La gran variedad de mecanismos plásticos que ocurren en esta estructura, junto con su papel de primer relevo de la entrada sensorial y a la vez de regulador de la conducta; confieren a este el estatus de un “gran modelo” para evaluar cómo se interrelacionan entre sí conducta, neuroanatomía y plasticidad.

La comprensión de estos mecanismos nos llevará a una visión más integral de la neurobiología y también a comprender los mecanismos que pueden estar ocurriendo y ser comunes en otras áreas cerebrales.

Uno de los mecanismos de plasticidad más evaluados son cambios en la actividad neuronal, evaluados por la expresión de genes tempranos. A continuación, describiré la relevancia del gen de respuesta temprana c-fos y su relación con la plasticidad neuronal inducida por conductas socio-sexuales. Así mismo en este trabajo también se evalúa cambios generados por la experiencia sexual sobre la sinaptogénesis evaluados por la expresión de sinaptofisina por lo que esta proteína también se describirá.

4.2.4 C-Fos, marcador de actividad neuronal

A) Propiedades generales de c-Fos

c-fos es un gen perteneciente a la categoría de genes de expresión temprana. Este grupo de genes se caracteriza por un aumento de la transcripción rápida (en el caso del c-fos 5 min), transitoria (para c-fos 30 min después es indetectable) y que no requiere de la síntesis de nuevas proteínas (Flavell & Greenberg 2008). El producto de la transcripción de c-fos (y en general los miembros de la familia Fos), mayoritariamente dimeriza con el producto de la familia de genes Jun (aunque existen otras configuraciones) formando el complejo transcripcional AP-1, el cual se une al ADN y promueve la expresión de otros genes, algunos de los reportados hasta el momento son el de neuropéptido Y, la metalopeptidasa 9 de la matriz, el inhibidor tisular de metalopeptidasa 1, la protoencefalina A y la prodinorfina. Pero dada su complicada trama y relación con otros

factores, la vía que prosigue tras la formación de AP-1 aún sigue siendo desconocida (Benito & Barco 2015). AP-1 está implicado en procesos de plasticidad; su delección específica conlleva déficits en plasticidad, formas de aprendizaje y memoria, aunque el mecanismo por el cual actúa en dichos procesos sigue siendo desconocido (Benito & Barco 2015, Flavell & Greenberg 2008). La activación sináptica resultado de la experiencia sensorial conlleva al aumento de la transcripción del gen c-fos, y a la formación del complejo de transcripción AP-1, esta relación entre la activación sináptica y la expresión de la proteína c-Fos provee la maquinaria necesaria para una respuesta adaptativa del individuo en respuesta a la experiencia, pues proporciona el mecanismo por el cual un estímulo puede llevar a los cambios necesarios para obtener un efecto permanente (mediante la transcripción proteica) que modifique de forma más permanente la respuesta de la neurona (Curran & Morgan 1987, Flavell & Greenberg 2008).

A pesar de la falta de conocimientos en lo relativo a la regulación de c-Fos, esta proteína ha representado un papel crucial en el estudio de las neurociencias, no solo por las características comentadas anteriormente, pues presenta un importante uso práctico para detectar neuronas recientemente activadas. Supone una gran herramienta, no solo porque es fácilmente inmunodetectable y que al mantenerse en el núcleo celular permite la distinción individual de las células. Además, los niveles basales de expresión de c-Fos son indetectables, dando de ese modo una relación señal/fondo muy favorable (Kaczmarek & Chaudhuri 1997).

B) C-Fos en estudios de conducta sexual

A diferencia de otras proteínas, c-Fos ha sido ampliamente relacionado con la conducta sexual. Su carácter de expresión ubicua ha llevado al estudio de este marcador en muchos de los relevos del circuito implicados en la expresión de la conducta sexual; desde los órganos sensoriales como el órgano vomeronasal (Halem et al 1999) y el epitelio olfativo (Norlin et al 2005), sus primeras áreas de relevo sináptico como el BOA (Halem et al 2001b), así como estructuras más implicadas en la ejecución de las conductas sexuales tales como el APM y el HVM (Halem et al 2001b). El estudio de estas áreas con la herramienta de la inmunodetección de c-Fos en diferentes condiciones ha llevado al descubrimiento de algunos hallazgos como los efectos de plasticidad celular inducidas por la experiencia sexual (Kollack-Walker & Newman 1997), la familiaridad de la pareja sexual (Halem et al 2001b), lesiones (Dudley & Moss 1994) entre otros modifica la expresión de c-Fos en el circuito implicado con la conducta sexual.

4.2.5 Sinaptofisina

A) Propiedades generales de la sinaptofisina

La sinaptofisina fue la primera proteína integral de membrana que se aisló de las vesículas sinápticas (Jahn et al 1985, Wiedenmann & Franke 1985). Su identificación y asociación con las vesículas sinápticas se asoció al tráfico y liberación vesicular. La sinaptofisina es una proteína transmembranal con un terminal amino citoplasmático, cuatro dominios transmembrana y un terminal carboxilo también citoplasmático. Sus dos bucles intra vesiculares presentan un puente disulfuro cada uno y en la parte intracitosólica con el COOH presenta una larga cadena de 9 residuos de tirosina, lo que

representa un sitio potencial de fosforilación de la proteína (Fig. 5). La sinaptofisina tiene dos regiones susceptibles a fosforilación, hasta el momento se ha identificado que la calmodulina cinasa II fosforila la proteína en una de sus regiones con serina, mientras que el producto del proto-oncogen 60 lo hace en su región con tirosina cuando las vesículas se encuentran individualmente, no asociadas (Greengard et al 1993). A pesar de la ubicuidad de la sinaptofisina en el sistema nervioso central y en algunas neuronas neurosecretoras (Gould et al 1986) poco es conocido sobre su función exacta e interacción con otras proteínas.

Dado su localización en la membrana vesicular la inmunodetección de esta proteína se asoció con el estudio y plasticidad de la sinapsis, aunque su papel específico en la exocitosis sináptica aún no es comprendido totalmente. Principalmente se proponen tres posibles hipótesis sobre su función, las cuales se basan en sus interacciones con otras proteínas y componentes vesiculares: a) Función en el ensamblaje de la vesículas a nivel del aparato de Golgi; b) Participación en la formación del poro transmembrana que llevaría a la fusión membranal y exocitosis del contenido vesicular; y c) Función en la participación de la endocitosis de la hendidura sináptica, creando la tensión negativa requerida para el inicio de la endocitosis y la posterior fisión membranal (Valtorta et al 2004).

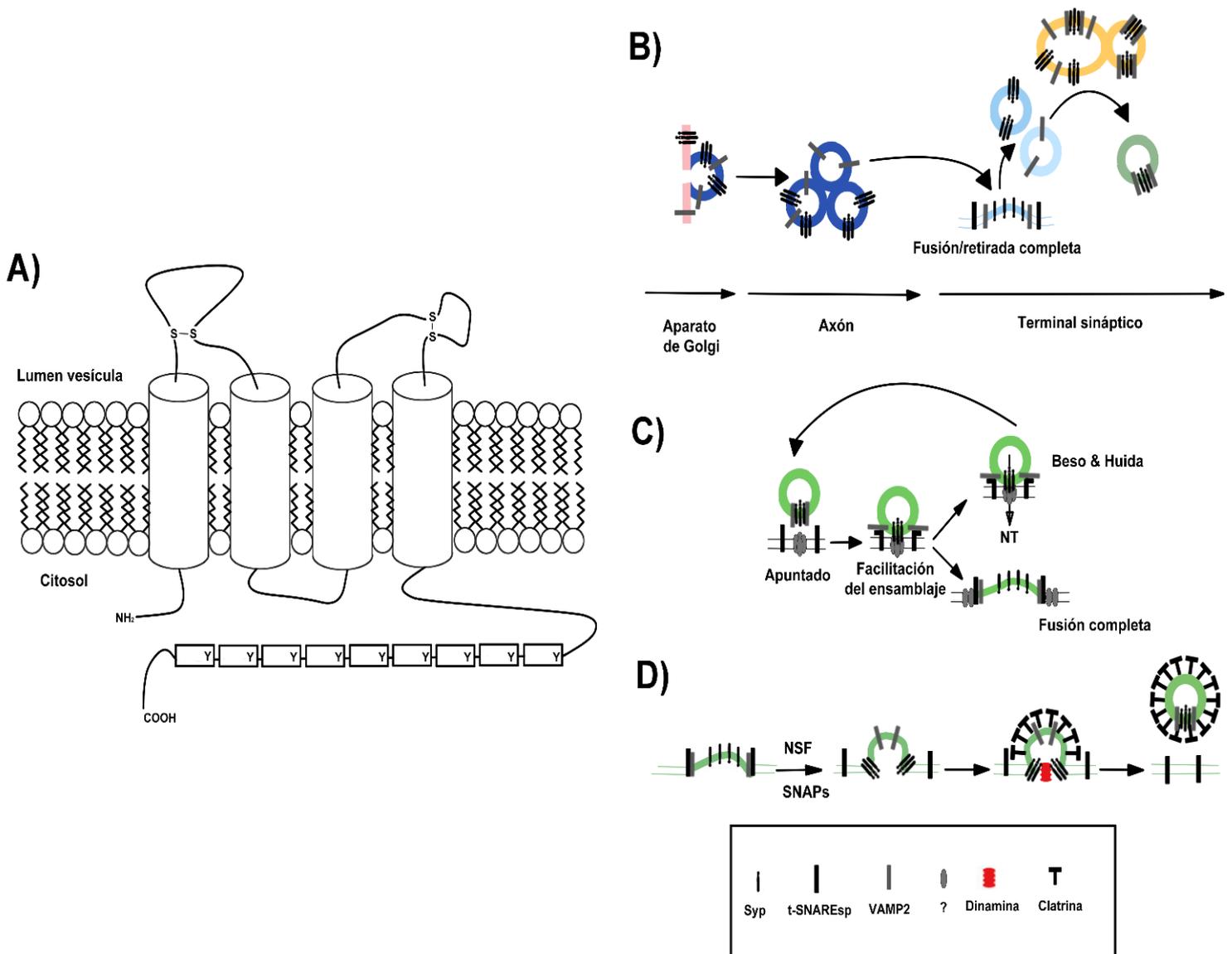


Figura 5. Estructura y función de la sinaptofisina. A) esquema de la estructura terciaria de la sinaptofisina, formada por un NH₂ terminal citoplasmático, cuatro dominios transmembranales, dos lazos intravesiculares hidrofílicos con un puente disulfuro cada uno, y un largo COOH terminal intracitosólico con nueve repeticiones que empiezan con residuos de tirosina. A la derecha, posibles funciones de la sinaptofisina en el ciclo endo-exocitosis de las vesículas sinápticas. B) A nivel del aparato de Golgi, la sinaptofisina podría jugar un papel en el ensamblaje de dominios especializados ricos en componentes de las vesículas sinápticas, en la membrana del aparato de Golgi. C) La interacción sinaptofisina-VAMP2 se pierde previamente a la fusión completa de la vesícula sináptica con la membrana presináptica. Cuando la vesícula se acopla a la membrana plasmática, la sinaptofisina interactúa con algún componente de la membrana aún desconocido para formar el canal rápido para formar la liberación por “beso y huida”. D) La sinaptofisina podría participar en la endocitosis de vesículas clatrina-dependientes de la membrana presináptica. La fisión podría estar facilitada por una interacción de sinaptofisina con dinamina (GTPasa que se une al cuello de la vesícula sináptica y a través de su constricción facilita la fisión de la membrana). Modificado de (Valtorta 2004).

Se ha propuesto que la sinaptofisina es requerida para la formación y/o exocitosis de las vesículas sinápticas (Valtorta et al 2004), estas observaciones fueron registradas en *xenopus* haciendo uso de ARN de interferencia, no obstante observaciones en roedores parecen demostrar un papel más contingente en este proceso (Eshkind & Leube 1995). Eshkind y Leube han demostrado que ratones sin el gen de la sinaptofisina (knock out) no solo son viables, también presentan formación de vesículas sinápticas aparentemente normales y no tienen una expresión alterada de otras proteínas vesiculares homólogas como la sinaptoporina o pantofisina, que pudiesen implicar un mecanismo de compensación (Eshkind & Leube 1995), aunque dichos ratones knock out han demostrado tener déficit de aprendizaje en tareas espaciales, con la prueba de reconocimiento de objetos (Schmitt et al 2009). Las únicas evidencias de un papel necesario de la sinaptofisina en la liberación sináptica ha sido reportado en los fotorreceptores de la retina (bastones), donde la delección del gen de sinaptofisina genera alteración en las membranas sinápticas, reducción del número de vesículas sinápticas independientes de clatrina, pero aumenta las vesículas recubiertas de clatrina, lo que ha llevado a hipotetizar un posible efecto de la sinaptofisina en la endocitosis vesicular independiente de clatrininas (Arthur & Stowell 2007), esta particularidad de los bastones podría deberse a que estos no expresan la pantofisina (o sinaptofisina II), una proteína homóloga que podría estar rescatando las funciones de la sinaptofisina (Evans & Cousin 2005).

A través de estudios con proteínas homólogas y análogas se ha descrito que la sinaptofisina podría formar diferentes configuraciones multiméricas, siendo una de ellas la descrita por Arthur y colaboradores, donde describen un complejo hexámero de

sinaptofisina que adquiere una estructura parecida a otros complejos proteicos con función de canal, como las conexinas y algunos canales mecanorreceptores (Arthur & Stowell 2007). A pesar de que esta formación hexamérica apunta a un posible papel en la formación del poro iniciador de la exocitosis, sigue sin haber evidencias claras al respecto.

A pesar de los misterios por resolver de esta proteína, su ubicuidad en las vesículas sinápticas le ha dado un carácter práctico para la detección de sinapsis y la fuerza de éstas (en el sentido de mayor cantidad de vesículas para responder a un estímulo). Además, se ha relacionado la sinaptofisina con la plasticidad sináptica, y aunque como se comentó anteriormente su déficit no parece alterar notablemente procesos de memoria o aprendizaje sí se ha descrito que protocolos inductores de potenciación a largo plazo (LTP) producen un aumento de la fosforilación de sinaptofisina, por lo que también se le atribuye alguna función en la plasticidad sináptica (Arthur & Stowell 2007).

También la expresión de sinaptofisina se relaciona con el enriquecimiento ambiental, el cual aumenta la expresión de esta proteína. Los animales con mayor expresión de sinaptofisina tienen mejor rendimiento en tareas de tipo espacial (laberinto de Morris) (Frick & Fernandez 2003). Estos estudios apuntan a que la sinaptofisina tiene un papel en este tipo de aprendizaje, pero que muy probablemente otras proteínas vesiculares, con función redundante, consigan mantener las funciones propias de la sinaptofisina. Por ejemplo, hay estudios en los que se evalúan como la sinaptogirina presenta una de estas funciones redundantes y como la delección conjunta de sinaptofisina y sinaptogirina generan una reducción de la LTP (Janz et al 1999).

B) Sinaptofisina en estudios de conducta sexual

La sinaptofisina ha representado un marcador de integridad sináptica/funcional del circuito, y referente de densidad sináptica (Bharadwaj et al 2013, Frick & Fernandez 2003). Hay muy pocos estudios respecto a la relevancia de sinaptofisina en un contexto de la conducta sexual. Por lo que este trabajo puede ser pionero en determinar si la experiencia sexual puede inducir plasticidad neuronal en la integridad sináptica de los circuitos neuronales, en el ratón hembra. Pues dada la dificultad de su naturaleza hormonal cíclica, la comunidad científica tiende a decantarse por el uso de machos, dejando la conducta sexual femenina a un lado.

Como antecedente del estudio de la sinaptofisina en un trabajo de conducta sexual tenemos el realizado por Bharadwaj y colaboradores (Bharadwaj et al 2013). Este trabajo se caracteriza por el uso de los ratones macho híbridos B6D2F1 (cruce de hembras C57BL/6J con machos DBA/2J), a los machos se les permitió adquirir experiencia sexual al copular previamente en cuatro sesiones, posteriormente fueron gonadectomizados y después de su recuperación se realizaron nuevamente pruebas de conducta sexual. De estos machos tras la castración alrededor de una proporción cercana al 30% continúan montando si se les permite el acceso a una hembra sexualmente receptiva. Estos machos que continúan montando después de la castración tienen una expresión de sinaptofisina, evaluada con Western blot, más elevada en el APM que los machos castrados que dejaron de copular. Estos resultados correlacionan la plasticidad sináptica con la experiencia sexual. Aunque sus datos son muy interesantes mencionan que en realidad no pueden discernir si el aumento de sinaptofisina es

compensatorio a la castración o bien aquellos animales que conservaron la conducta de cópula presentaran una expresión inicial mayor de esta proteína antes de ser castrados. Este estudio también evalúa otras proteínas relacionadas a la integridad estructural del circuito como la espinofilina (también relacionada con plasticidad sináptica, en la formación de espinas sinápticas) (Feng et al 2000) y tau (relacionada principalmente con la estabilización de los microtúbulos en las neuronas) (Guo et al 2017).

5. **Justificación**

En los mamíferos adultos el despliegue de la conducta sexual es innata. Sin embargo, su ejecución reiterada genera que esta conducta sea más eficiente y que las lesiones de las regiones neuronales que la regulan tengan un efecto menos severo. El ratón hembra es un buen ejemplo de la relevancia de la experiencia sexual, la hembra en sus primeros encuentros sexuales despliega niveles de receptividad muy bajos, la repetida estimulación sexual conlleva a altos niveles de lordosis. Esta modificación en la conducta hace sospechar que algunas de las áreas implicadas en la conducta sexual presentan cambios plásticos a nivel neuronal, pues se modifica la respuesta ante el mismo estímulo. Basándonos en los antecedentes descritos en la literatura, proponemos principalmente cambios en el número de neuronas activadas en respuesta al estímulo sexual. Estos se pueden deber a cambios directos en el umbral de respuesta de las neuronas, o debido a el reclutamiento/silenciamiento de estas células por parte de otras neuronas. También proponemos cambios a nivel presináptico específicamente en la sinaptogénesis.

El presente estudio se enfoca en determinar si el incremento de la receptividad sexual en el ratón hembra conlleva cambios en la actividad neuronal y en el arreglo sináptico de las regiones cerebrales más importantes que modulan la conducta sexual femenina en roedores. Estos estudios contribuirán a entender los mecanismos de plasticidad neuronal involucrados en la modulación de la conducta sexual femenina en roedores.

6. **Hipótesis**

1.- El incremento de la experiencia sexual aumentará la expresión de la proteína c-Fos en respuesta a la cópula y a la exposición a olores sexualmente relevantes, en las áreas cerebrales del ratón hembra implicadas en conducta sexual: el bulbo olfatorio accesorio (BOA), el área preóptica medial (APM) o el hipotálamo ventromedial (HVM).

2.- En el ratón hembra la experiencia sexual incrementará la expresión de sinaptofisina en las neuronas del bulbo olfativo (BO), el área preóptica medial (APM), el hipotálamo ventromedial (HVM) o la amígdala medial (Me).

7. **Objetivos**

1.- Cuantificar el número de neuronas activadas durante la conducta sexual y la exposición a olores sexualmente relevantes mediante la detección de la expresión de c-Fos, en ratones hembra con diferente nivel de experiencia sexual. Concretamente en las áreas cerebrales con relevancia sexual: el BOA, el AMP y el HVM.

2.- Cuantificación de la proteína sináptica sinaptofisina, en hembras de ratón con diferente nivel de experiencia en el BO, el APM, el HVM y la Me.

8. Métodos

8.1 Animales

Para este estudio se usaron ratones hembra de la cepa Hsd:NSA (CF1) sin experiencia sexual previa (n=91), obtenidas de la colonia local del bioterio del Instituto de Neurobiología (UNAM). Los animales tenían tres meses de edad y su peso fue de entre 25-30 g. Las hembras fueron estabuladas en grupos (5-7 por caja) en una habitación separada de los machos, en un ciclo de luz invertido de 12 h luz/12 h de oscuridad y con agua y comida ad libitum. Las hembras fueron bilateralmente ovariectomizadas dos semanas antes del inicio del experimento, para este procedimiento se usó anestesia general (0.05 ml/g; 30% ketamina, Anesket; 10% xilacina, Cheminova). Para inducir receptividad sexual en las hembras se usó un protocolo de inducción hormonal con inyecciones subcutáneas de benzoato de estradiol (EB, Sigma-Aldrich) y progesterona (P; Sigma-Aldrich) usando aceite de maíz como vehículo. Los ratones macho fueron previamente entrenados para ser sexualmente expertos (al menos tres sesiones de cópula), sus condiciones de estabulamiento fueron las mismas que las hembras, sólo que en una habitación separada del de las hembras y fueron alojados en cajas individuales. Todos los experimentos fueron llevados a cabo de acuerdo con el “Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de la Investigación para la Salud” del Ministerio de Salud Mexicano (Norma Oficial Mexicana, NOM-ZOO-069) y las guías del NIH. Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la UNAM (INEU/SACB/040).

Para inducir estro en las hembras ovariectomizadas es necesario la inyección de BE 48 h antes y P 4 h antes de la prueba conductual. En la literatura se puede encontrar el uso de diferentes dosis de estas hormonas para la inducción de la receptividad sexual (de 0.5 μg a 10 μg /ratón de BE, y de 100 μg a 830 μg /ratón de P) (Bonthuis et al 2011, Moncho-Bogani et al 2004, Shughrue & Dorsa 1994, Thompson & Edwards 1971), por lo que consideramos oportuno realizar un estudio para determinar la dosis de BE mínima efectiva (0.5 μg , 1 μg y 2 μg /ratón) para la inducción de receptividad sexual utilizando una dosis fija de P en 100 μg /ratón.

De esta forma obtuvimos un grupo de ratones hembra de la cepa C57BL/6, las cuales se asignaron aleatoriamente a una de las concentraciones de BE (n=6 por grupo). Las pruebas de conducta sexual se realizaron en las cajas de acrílico utilizando machos de la misma cepa. En estas pruebas se registró el reflejo de lordosis, se asignó un valor de "1" si la hembra en respuesta a la monta arquea la espalda y desvía la cola para permitir la inserción del pene, y "0" si la hembra no presenta estos reflejos y despliega conductas de rechazo o agresión al macho (Blaustein & Erskine 2002). El coeficiente de lordosis (CL), se calculó con el número de respuestas de lordosis dividido por el número de montas. Las hembras reemplazadas hormonalmente fueron colocadas con un macho para una sesión de cópula de 1 h (o hasta la eyaculación). Estas pruebas conductuales se repitieron seis veces, realizándose cada prueba con una semana de diferencia.

Debido a problemas para obtener todos los animales necesarios para nuestros experimentos se nos presentó la opción de cambiar de la cepa CF1 (con mayor disponibilidad en el bioterio del INB). Con intención de evaluar si esta cepa tiene el

mismo comportamiento se agregó posteriormente otro grupo (n=6) de ratones hembra de la cepa CF1 a las cuales se les inyectó 1 µg/ratón de BE (dosis óptima del experimento anterior). Los resultados de este piloto se discutirán el apartado de resultados.

8.2 Grupos experimentales

Para determinar los efectos de la experiencia sexual sobre la actividad neuronal y la expresión de sinaptofisina, se obtuvo un grupo de hembras de la cepa C-F1, las cuales fueron asignadas de forma aleatoria en los siguientes grupos: a) Sin experiencia sexual (SES), donde las hembras solo recibieron el tratamiento hormonal sin estimulación sexual (n=35); b) Sexualmente inexpertas (SI), donde las hembras copularon en una única sesión de 1 h o hasta la eyaculación del macho (n=17); y c) Sexualmente expertas (SE), donde las hembras copularon con el macho una vez por semana durante seis semanas (n=39) (Fig. 6).

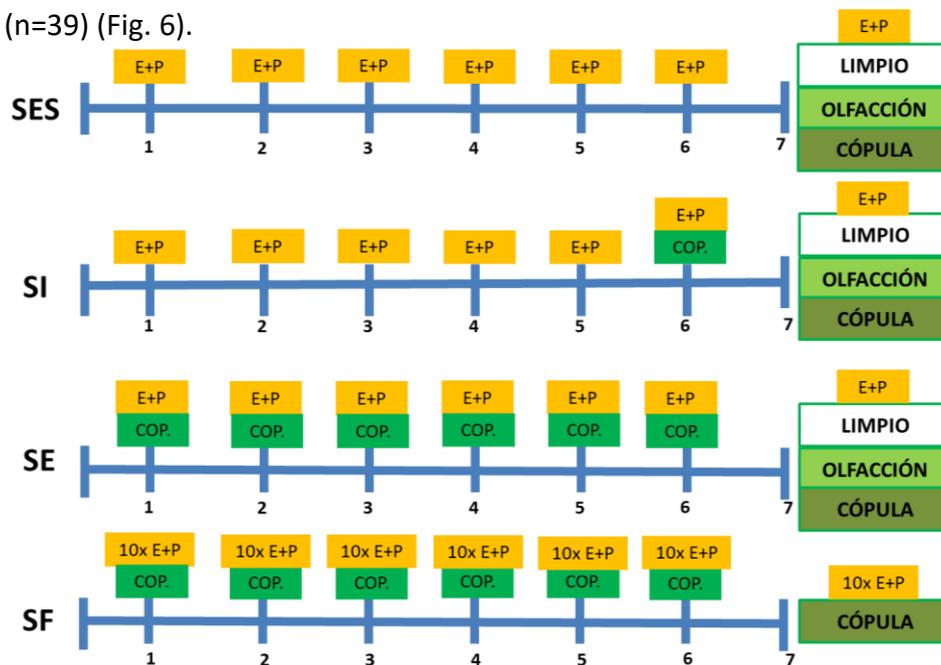


Figura 6. Cronograma experimental. A la izquierda se indica cada uno de los grupos: Sin Experiencia Sexual (SES), Sexualmente inexperta (SI), Sexualmente Expertas (SE), y SF (Suprafisiológicas). En el centro se observan las líneas temporales de las pruebas conductuales, siendo cada una de las sesiones separadas por una semana, en este esquema se ilustra en que sesiones recibieron tratamiento hormonal (E+P) y realizaron la prueba conductual de cópula (COP.). En la 7ª sesión se representa la división en los tres subgrupos: a) aserrín limpio, b) aserrín impregnado con secreciones de macho, olfacción y c) cópula.

En la semana siete, estos mismos grupos fueron divididos a su vez en tres subgrupos: i) Limpio, las hembras fueron expuestas a aserrín limpio en una caja nueva; ii) Exposición a olores de macho, las hembras fueron expuestas a aserrín impregnado de secreciones de macho; y iii) Cópula, las hembras recibieron otra sesión de cópula en la caja del macho (Fig. 6).

Las hembras SI y SE fueron expuestas a aserrín impregnado del macho con el que copularon, para evitar diferencias por la exposición a diferentes feromonas masculinas. El aserrín impregnado de macho fue obtenido de las cajas hogar en las que se albergó el macho por cuatro días. Los machos sexualmente expertos fueron asignados al azar a cada hembra, y el mismo macho fue usado en cada una de las sesiones, a no ser que no montaran a la hembra durante los primeros 20 min de la prueba, en ese caso el macho se cambió por otro sexualmente experto. Cada sesión de cópula fue grabada, y la respuesta de lordosis fue registrada. Con estos valores se cuantificó el cociente de lordosis ($CL = \text{número de lordosis efectuadas} / \text{número de montas recibidas}$).

Para evaluar si las hormonas gonadales por sí mismas pueden inducir un nivel alto de receptividad sexual, incluimos un grupo adicional de seis hembras ovariectomizadas que recibieron una dosis suprafisiológica de EB (10 $\mu\text{g}/\text{ratón}$) y de P (1 $\text{mg}/\text{ratón}$). Este grupo nos permitió evaluar si la receptividad sexual puede ser inducida con altas dosis de hormonas indicativo de una relación lineal entre estas y la receptividad sexual.

8.3 Histología

Las hembras fueron sacrificadas 90 min después de la prueba conductual, con una sobredosis anestésica (315 mg/kg de pentobarbital sódico). Las hembras fueron

perfundidas intracardialmente con una solución de solución amortiguadora de fosfatos (PBS 0.1M, pH 7.2) seguido por una al 4% de paraformaldehído. Se extrajeron los cerebros y fueron post-fijados por una hora en una solución al 4% de paraformaldehído. Posteriormente, fueron almacenados en una solución de sacarosa al 30% (J.T. Baker) a 4°C.

Las regiones de interés fueron obtenidas mediante cortes coronales de 20 µm, haciendo uso del medio de montaje, Tissue Tek (Sakura Laboratories), usando el criostato Leica CM 1850-3-1. Las rebanadas resultantes, fueron preservadas con una solución anticongelante (300 gr de sacarosa y 600 ml de etilen-glicol por cada litro de PBS 0.05 M) a -20°C.

8.4 Inmunohistoquímica para c-Fos

La solución anticongelante fue retirada, y las rebanadas de tejido fueron lavadas con PBS (0.1M, pH 7.2), posteriormente fueron incubadas durante 30 min con una solución de PBS con 1% de H₂O₂ y butirato de sodio al 1%, para inhibir las peroxidasas internas y exponer los epítomos.

Después de tres baños consecutivos de PBS, el tejido fue incubado durante toda la noche (>16 h) con el anticuerpo policlonal primario para c-Fos hecho en conejo (1:500, Genetex) a 4°C. Después de la incubación el tejido fue lavado de nuevo con tres baños de PBS y dejado a incubar con el anticuerpo policlonal secundario IgG anti-conejo (1:1000, Vector Laboratories) durante dos horas a temperatura ambiente. Una vez que las muestras fueron lavadas nuevamente, se incubaron con la solución de PBS 0.1M tritón-X (TX, 1%) con el complejo avidina biotina (ABC elite kit, Vector laboratorios).

Como cromógeno se usó diaminobenzidina (DAB, Vector Laboratories), en una solución de 0.6 mg/ml de DAB en 0.1M PB y 0.30 μ l/ml de H₂O₂. Las rebanadas se montaron sobre cubreobjetos gelatinizados y se dejaron secar sobre la placa calefactora (una semana aproximadamente). Al finalizar el secado las rebanadas fueron sumergidas en un tren de alcoholes de graduación creciente, combinados con una contratinción de violeta de cresilo (tinción de Nissl). La tinción de Nissl es una técnica clásica diseñada por Franz Nissl (1884), consiste en el uso de un colorante básico (violeta de cresilo) que se une de forma no específica a moléculas con gran número de cargas negativas, de esta forma se une principalmente a los ácidos nucleicos presentes en el núcleo celular, los lavados posteriores consiguen eliminar gran parte del colorante excepto en aquellos lugares donde las cargas negativas lo retienen.

El tejido fue lavado para eliminar el excedente de colorante, el aspecto de la tinción deja un color morado/violáceo en el núcleo (mayor concentración de ácidos nucleicos) y una ligera marca rosada en el citoplasma (mayormente debido a los ácidos ribonucleicos presentes en citoplasma, principalmente el ribosómico). Esta tinción no interfiere con la inmunohistoquímica y presenta la posibilidad de localizar los núcleos cerebrales aun sin presentar marcaje de la proteína a estudiar. Finalmente, el tejido fue cubierto con resina de montaje Permout (Fischer Scientific).

8.5 Inmunofluorescencia para sinaptofisina

Se usaron cortes de cerebro de los subgrupos de cópula, los cuales fueron lavados para eliminar la solución anticongelante se procedió a incubar el tejido en una solución de butirato de sodio 0.05% en PBS durante 15 min. Tras esto se lavó de nuevo el tejido tres

veces con PBS y TX al 1% incubando seguidamente con una solución de albúmina al 1% en esta misma solución durante 30 min con intención de evitar las uniones inespecíficas de los anticuerpos.

Posteriormente se incubó el tejido en una solución de PBS TX 0.1% y albúmina 1% con el anticuerpo primario de sinaptofisina (1:1200) hecho en conejo (Texas Laboratories) durante 24 h en agitación a 4°C. Al finalizar el incubado, el tejido se lavó nuevamente y se incubó en una solución con albúmina 0.1%, seguida por una incubación en el anticuerpo secundario IgG anti-conejo biotinilado (Vektor laboratories, BA-1000) en una solución con PBS TX 0.1% y albúmina al 0.1% (1:400, Sigma laboratories).

Después de la incubación con el anticuerpo secundario, se lavó de nuevo el tejido para proseguir con una incubación de 90 min con Streptoavidina (1:1500) conjugado con Alexa 488 (Thermo Fisher Scientific). Al finalizar la incubación, se lavó el tejido de nuevo tres veces y se incubó con una solución de Hoetsch (1:1000, Sigma-Aldrich), terminando con tres lavados para eliminar el excedente, antes de ser montado en portaobjetos, los cortes se cubrieron con cubreobjetos y aquamont (Polyscience).

8.6 Fotografía y análisis de imágenes para c-Fos

Para la obtención de las fotografías se utilizó un microscopio Olympus BX60 con una cámara adaptada Evolution VF, una platina motorizada Prior Proscan y una computadora con el programa Image-Pro Plus 7.0 (Fig. 7).

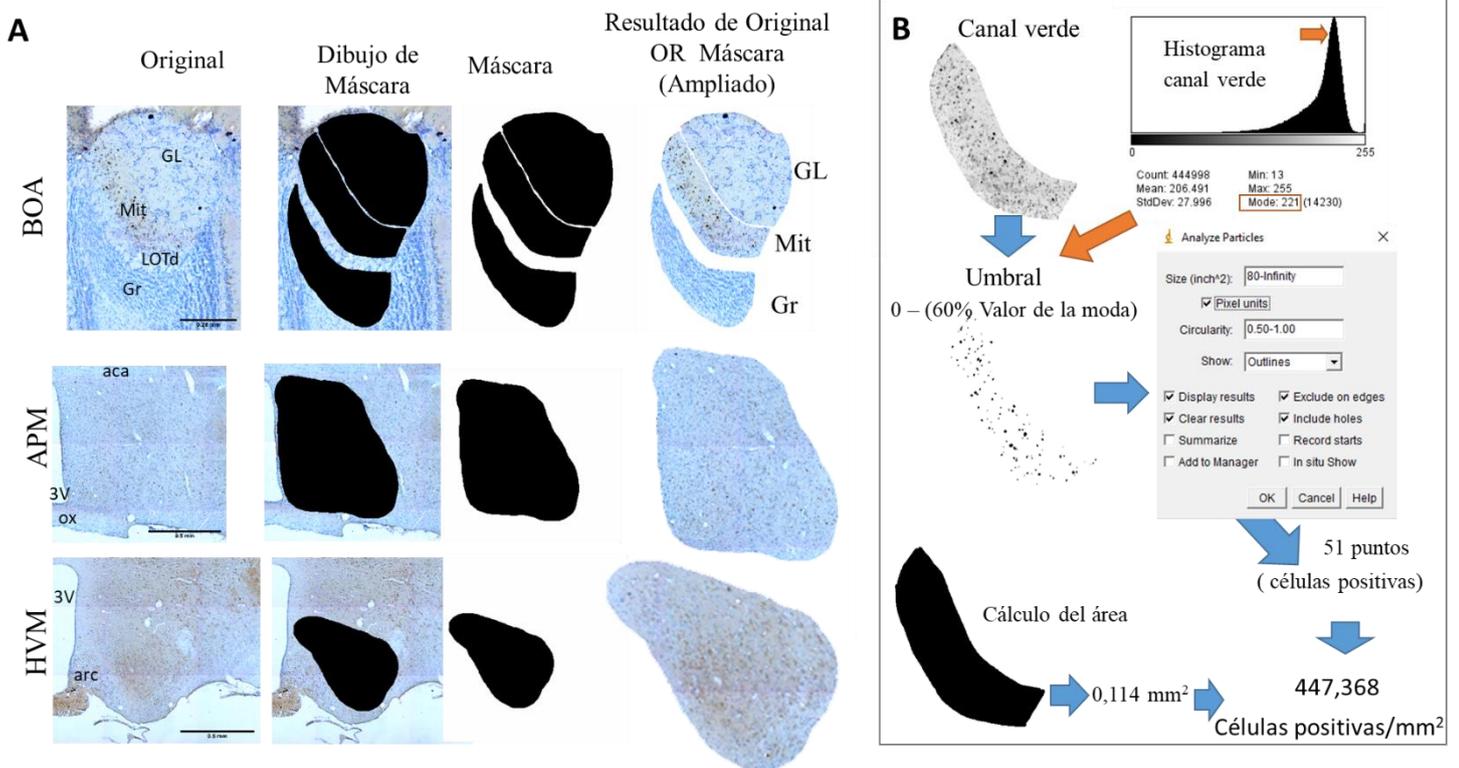


Figura 7. Representación del análisis de imágenes. A) imágenes representativas y la segmentación realizada para excluir las áreas fuera de la estructura de interés. La imagen de “resultado de Máscara OR Original” esta amplificada para mayor apreciación de los detalles. Se representa un lado del APM y del HVM, pero ambos hemisferios fueron considerados para el análisis. B) Representación del proceso de cuantificación de cada imagen, aplicado en este caso a la capa mitral del BOA, mostrado en A. Para cada estructura se analizaron tres fotografías y se promedió el resultado de estas.

Como referencia anatómica se usó el atlas, The mouse brain in stereotaxic coordinates (Paxinos & Franklin 2004), de esta forma las coordenadas de las regiones neuronales de interés en base a Bregma fueron: BOA, 3.56 mm; APM, 0.14 mm e HVM, -1.34 mm. Para el análisis de imágenes, se seleccionaron tres rebanadas de ambos hemisferios de cada región de interés, estas fueron equivalentes entre cada uno de los individuos. Las fotografías fueron tomadas con el objetivo de 10 X haciendo uso de la función TileScan para obtener una fotografía completa de la estructura de interés (Fig. 7A). En caso de no recuperar tres cortes sin daño de ambos hemisferios de las regiones neuronales, los sujetos fueron eliminados del análisis (Tabla1).

Tabla 1. Total de sujetos en cada grupo, y sus correspondiente subgrupos, analizados para c-Fos. El número de sujetos en cada estructura cerebral representa los animales de los cuales se pudo obtener tres rebanadas completamente preservadas sin daño aparente.

c-fos	Total n	Conducta	GL	Mit	Gr	MPOA	VMH	
SES	35	SES limpio	12	7	8	7	8	8
		SES olfacción	12	9	9	9	6	8
		SES cópula	13	9	9	8	11	11
SI	17	SI limpio	5	5	5	5	5	5
		SI olfacción	6	5	6	5	6	6
		SI cópula	6	5	5	5	5	6
SE	39	SE limpio	12	9	9	7	9	10
		SE olfacción	13	8	9	8	9	8
		SE cópula	14	9	10	10	10	10

Las imágenes resultantes fueron aleatorizadas y renombradas para ocultar su procedencia y el análisis de imágenes fuese ciego. Para el análisis se recortó de la macrofotografía la estructura de interés. Posteriormente sobre la imagen se contorneo la estructura para obtener una imagen binaria denominada máscara. La máscara nos permite medir el área de la estructura. Con la operación de disyunción (Imagen original OR Imagen máscara) se obtuvo la imagen recortada que engloba el área neuronal de interés (Fig. 7A).

El tratamiento procede con una división de los tres canales de color de la imagen, siendo seleccionado el canal verde por su mayor contraste, definición y distinción entre marcaje de DAB y Nissl (Fig. 7B). De la imagen de color verde se obtiene el parámetro moda de todos los píxeles, y este valor se considera representativo del parénquima no marcado. Con este valor se calcula el 60% de la moda y se toma este nuevo valor como referencia. Este valor se usará como umbral máximo de referencia para la binarización, convirtiendo todos los valores por debajo del 60% de la moda en señal de marcado (más oscuros en

la imagen) y eliminando aquellos valores por encima de dicho umbral (más claros en la imagen). A la imagen binaria resultante, se le aplica como medidas correctoras de rellenado (transformación para una imagen binaria que consiste en convertir a negro aquellos grupos de píxeles blancos rodeados por píxeles negros) y una corrección de vertiente (comando para separar partículas adyacentes por su línea de unión más estrecha). Para el conteo se usó como medidas discriminatorias el tamaño y la circularidad, siendo descartados todas aquellas partículas inferiores a 80 píxeles (17,16 μm^2) y de una circularidad inferior a 0.5 [Circularidad= $4\pi\left(\frac{\text{Área}}{\text{Perímetro}^2}\right)$] (Fig. 7B).

La imagen resultante del conteo denominadas como contornos fueron fusionada con la imagen original con una operación de coincidencia (AND), para evaluar visualmente posibles artefactos en el conteo y enmendarlo. También se comparó con las imágenes del canal rojo y azul con propósitos de corrección (Fig. 7B). Este procedimiento fue modificado ligeramente del reportado por Salais-Lopez (Salais-Lopez et al 2018).

Los datos de ambos hemisferios del cerebro fueron sumados (tanto número de células marcadas como área de la estructura), calculando el número de células marcadas por 1 mm^2 . Promediamos los tres cortes pertenecientes a los mismos individuos.

8.7 Fotografía y análisis de imágenes para sinaptofisina

La obtención de las fotografías de la inmunofluorescencia de sinaptofisina se realizó en el microscopio confocal Zeiss LSM 700. Para calcular la intensidad de la señal de fluorescencia se usó el programa de análisis de imagen, ImageJ versión 1.52i.

En el BOP, se delimitó un cuadro de 600x500 micras correspondientes a la parte más medial, el cual engloba cada una de las capas (glomerular, mitral y granular). Para el análisis se promedió por separado cada una de las capas presentes en las tres rebanadas de cerebro por ratón (Fig. 8).

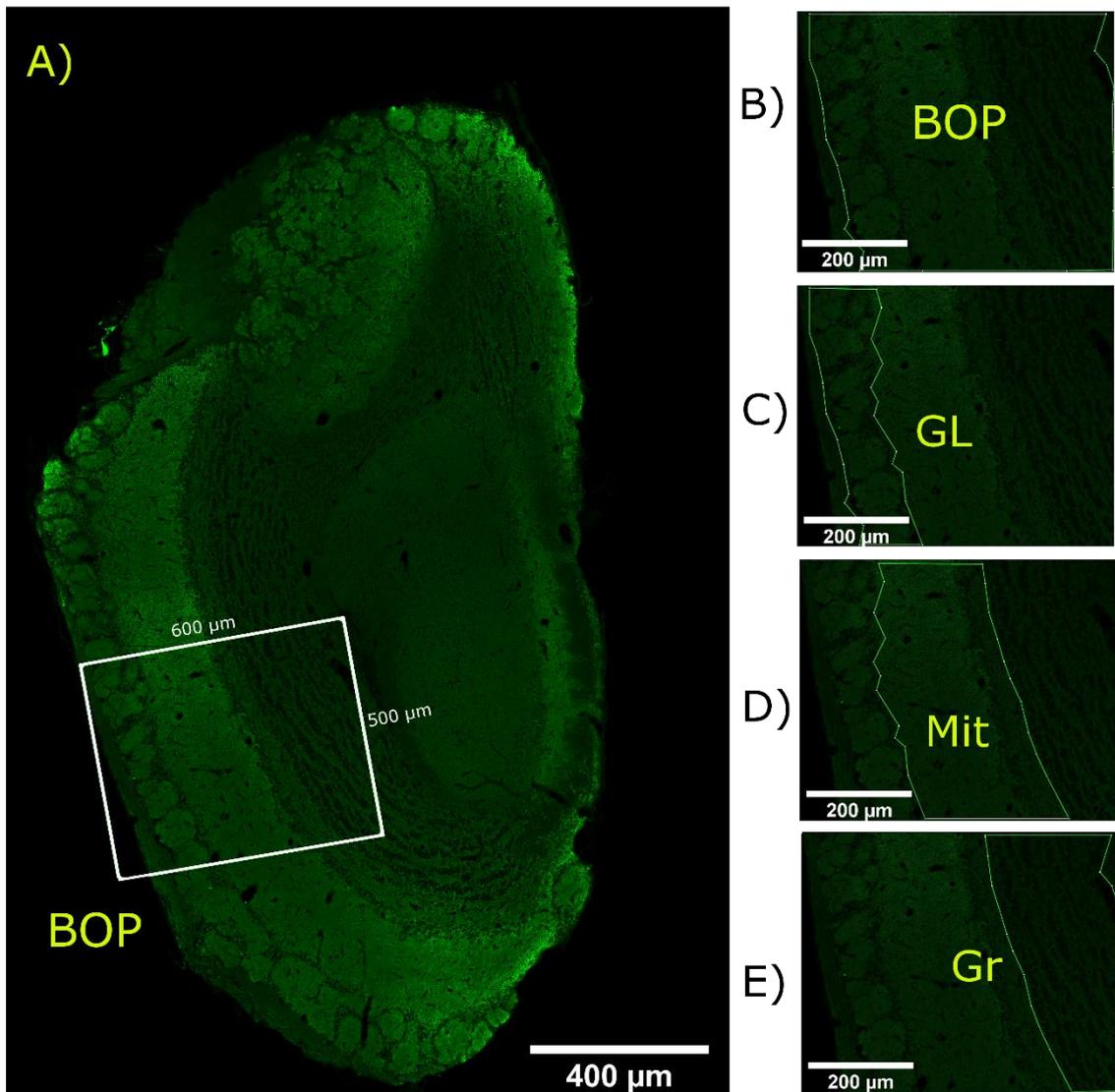


Figura 8. Fotografía de la inmunofluorescencia de sinaptofisina tomada con el microscopio confocal de un BOP. A) Se representan el área tomada como referencia para el BOP. Área tomada para el análisis de BOP, la capa glomerular (C), la capa mitral (D), y la capa granular (E). A, B, C y D se encuentran en la misma escala (Cuadro remarcado en A). Como en el caso de c-Fos, también se promedió el valor de 3 fotografías, siendo en este caso el valor de Intensidad.

Para el BOA se tomaron tres fotografías y se limitó en sus tres capas (glomerular, mitral y granular). Se promediando el valor medio de los pixeles de cada región de interés, y a su vez se promedió el valor presente de las tres rebanadas, del mismo modo que se hizo en el BOP (Fig. 9).

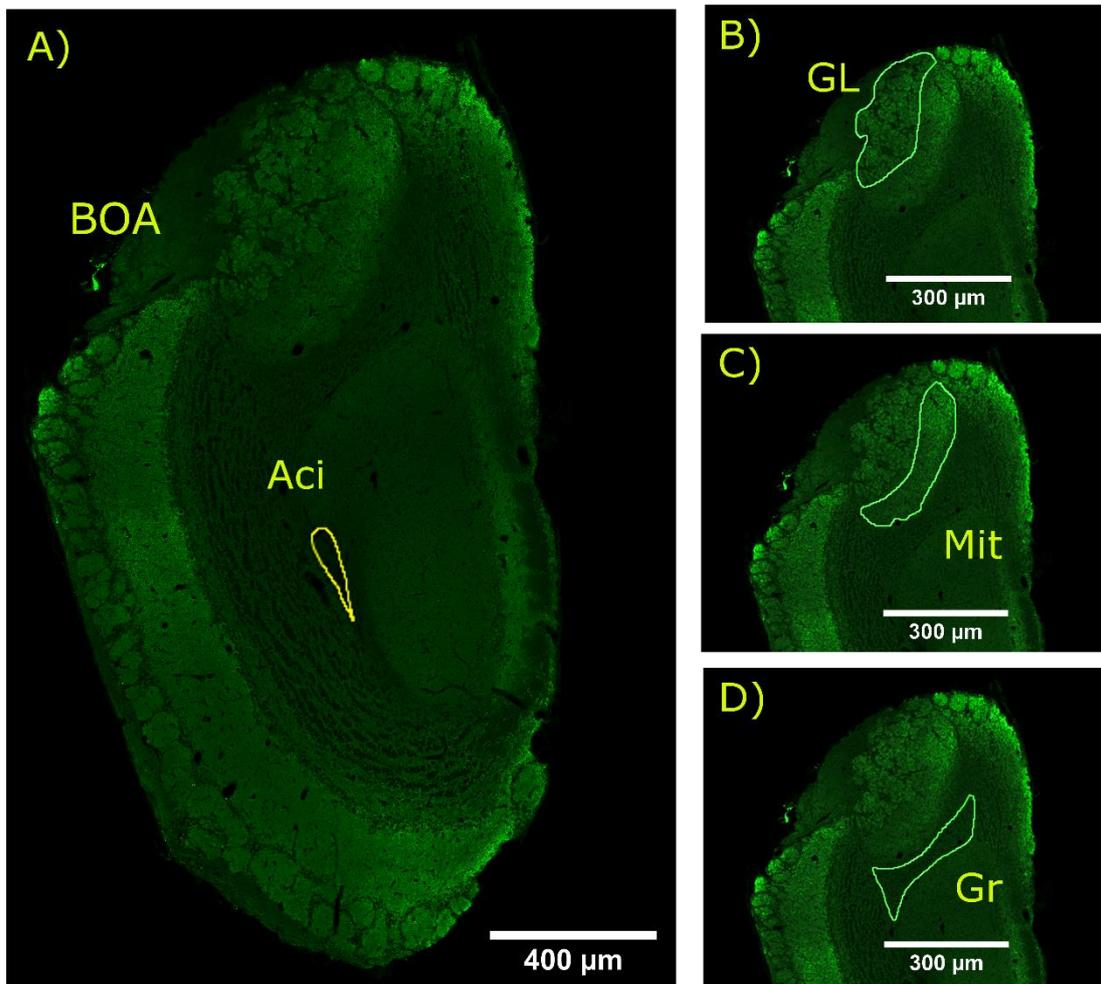


Figura 9. Fotografía de la inmunofluorescencia de sinaptofisina tomada con el microscopio confocal de un BO. A) Se representan las áreas tomadas como referencia para el BOA, y el área de la comisura anterior (Aci) tomada como valor de fluorescencia de fondo (más detalle en el cuerpo del artículo).

Área tomada para la capa glomerular (B), la capa mitral (C), y la capa granular (D). B, C y D se encuentran en la misma escala. Como en el caso de c-Fos, también se promedió el valor de tres fotografías, siendo en este caso el valor de Intensidad.

A pesar de contar con un control negativo con tejido sin incubar en el anticuerpo primario, consideramos oportuno, tomar un control interno para cada individuo. Como

control interno tomamos la comisura anterior intrabulbar (Aci), un tracto nervioso presente en el centro del BOP (Fig. 8A). Al ser un tracto presenta muy pocas sinapsis y por tanto baja expresión de sinaptofisina. Con el valor promediado de las tres rebanadas de esta estructura establecimos un valor base de fluorescencia sin señal de sinaptofisina (fondo) y realizamos un índice para determinar el cambio en la señal en cada una de las capas en relación con la Aci, en cada uno de los individuos. Este método es una variante del reportado por Au-Wallrafen (Au - Wallrafen et al 2019).

Para la cuantificación de sinaptofisina en la Me, se tomó como referencia anatómica el tracto óptico y se delimitó el área de esta estructura haciendo uso de las herramientas de ROI del ImageJ, y como el resto de las estructuras se ponderó el valor de la intensidad presente en tres fotografías de la estructura. Debido al mayor tamaño del HVM y del APM, que complicaba tener dichas estructuras completas dentro del plano focal, se optó por tomar un área representativa. Por ello se tomó como área de interés un círculo de 300 μm de diámetro a nivel de la altura ventromedial del tercer ventrículo (usando como referencia el atlas de Paxinos) (Fig. 10).

Estas tres estructuras cerebrales también fueron normalizadas con el mismo método usado para BOA y BOP, usando Aci como valor de referencia de fluorescencia fondo.

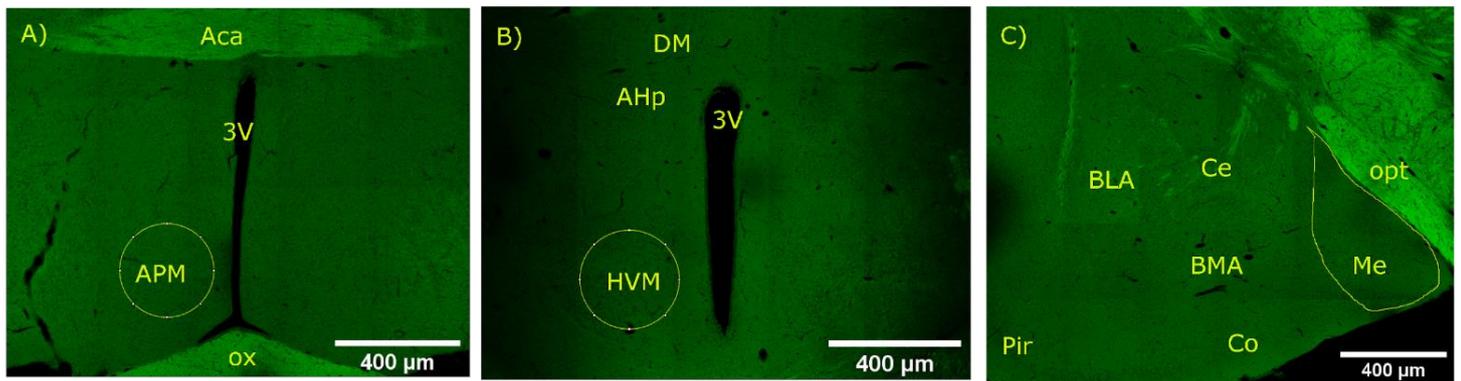


Figura 10. Inmunofluorescencia representativa de sinaptofisina tomada con fotografías el microscopio confocal del área preóptica medial (APM, A), hipotálamo ventromedial (HVM, B), y la amígdala medial (Me, C). Se representa las áreas tomadas como referencia para el AMP y el HVM (circulo de 300 µm de diámetro). Se promedió el valor de tres fotografías para obtener el valor de la intensidad de la señal. Las referencias y abreviaturas fueron tomadas del Atlas *The mouse brain in stereotaxic coordinates* (Paxinos & Franklin 2004) 3V, tercer ventrículo; Aca, comisura anterior, parte anterior; AHp, hipotálamo anterior, parte posterior; BLA, basolateral amígdala; BMA, basomedial amígdala; Ce, amígdala central; Co, amígdala cortical; DM, núcleo hipotalámico dorsomedial; MPOA, área preóptica medial; opt, tracto óptico; ox, quiasma óptico; Pir, corteza piriform; y HVM, hipotálamo ventromedial.

8.8 Análisis estadístico

Los datos de la conducta sexual y el número de células positivas a c-Fos no tuvieron una distribución normal, por lo que fueron analizados mediante pruebas no-paramétricas. La receptividad sexual (CL) a lo largo de las sesiones de cópula fue evaluada con el análisis de varianza de Friedman ($gl=5$ en el estudio de determinación de la dosis, $gl=6$ para la comparación de las 7 sesiones del grupo SE). El número de células c-Fos positivas fueron evaluadas con la prueba de Kruskal-Wallis ($gl=2$). En caso de presentarse efectos significativos se realizó la prueba de U de Mann-Whitney como *post-hoc*. Para las correlaciones entre la conducta sexual y la actividad neuronal se usó la correlación de Spearman.

En el caso de los datos de sinaptofisina, los datos obtenidos de la capa mitral, granular y glomerular del BOA, HVM y Me, no presentaron una distribución normal, por lo que fueron analizados con la prueba de Kruskal-Wallis ($gl=2$) seguido en caso de diferencias significativas por una U de Mann-Whitney. En el caso de las tres capas del BOP y el APM, los datos tuvieron una distribución normal, por lo que fueron analizados con una ANOVA de una vía ($gl=2$).

9. Resultados

9.1 Estudio para determinar la concentración óptima de estradiol para inducir receptividad sexual

En todos los grupos tratados con las diferentes dosis de BE (0.5, 1 y 2 $\mu\text{g}/\text{ratón}$) y P (100 $\mu\text{g}/\text{ratón}$) de la cepa C57BL/6 (C57) se observan niveles bajos del CL en las primeras sesiones y altos en la última (Fig. 11). La dosis de 0.5 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ fue descartada debido a que indujo bajo CL en las sesiones 3, 4 y 5. Los ratones hembra con las dosis de 1 y 2 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ mostraron un comportamiento similar, por lo que la dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ fue seleccionada. Los ratones de la cepa CF1 fueron tratados con 1 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ de BE y 100 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ de P. Esta cepa, al igual que la C57, mostró en la primera experiencia sexual bajos niveles de receptividad, la cual gradualmente fue incrementando hasta mostrar altos niveles de CL en las últimas pruebas (Fig. 10). Además, si comparamos los datos del CL obtenidos en la cepa C57 y CF1 que recibieron la misma dosis de BE (1 $\mu\text{g}/\text{ratón}$), podemos observar que no hay diferencias significativas en ninguna de sus sesiones utilizando la prueba U Mann-Whitney ($U=12$ $p=0.14$; $U=6$ $p=0.06$; $U=12$ $p=0.39$; $U=16.5$ $p=0.81$; $U=17.5$ $p=0.93$; y $U=8$ $p=0.13$; para cada sesión de la 1-6 respectivamente). De

esta forma decidimos proceder con el uso de 1 μg /ratón de BE para el resto de nuestros experimentos con la cepa CF1, dado que esta cepa manifiesta el mismo comportamiento respecto a nuestro interés que la C57.

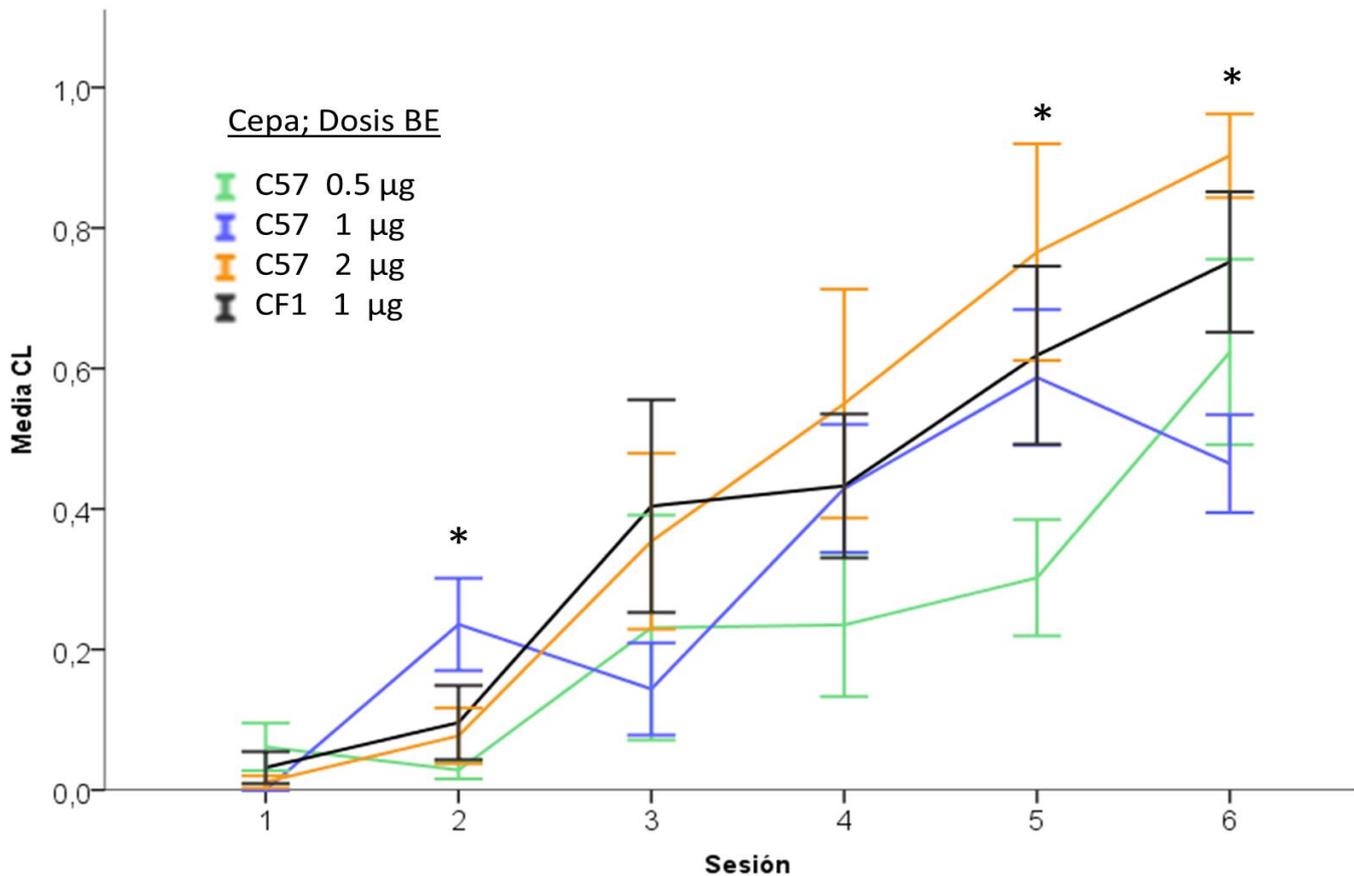


Figura 11. Gráficas de los resultados de cociente de lordosis de las hembras a lo largo de las sesiones (semanales) en el experimento preliminar para la determinación de las dosis hormonales. A pesar de que todos los grupos de la cepa C57 incrementan su receptividad sexual con la experiencia, el grupo con 0.5 μg /ratón de BE presenta valores más bajos de CL en la 2ª y 5ª sesión, razón por la que nos decantamos por el uso de 1 μg /ratón de BE. La cepa CF1 tratada con 1 μg /ratón de BE se comparó con la misma dosis de la C57, resultando no diferir en ninguna de las sesiones (más información en el cuerpo del texto). * p-valor <0.05 al comparar las tres dosis de la cepa C57 con la prueba de Kruskal- Wallis 2 gl.

9.2 Efecto de la experiencia sexual en la receptividad sexual del ratón hembra.

9.2.1 Conducta sexual

Los datos de conducta obtenidos corroboran los cambios en la receptividad sexual en el ratón hembra (evaluado con el CL). Como esperábamos, el incremento en el CL se observa en el grupo SE. La receptividad sexual aumenta de forma gradual a lo largo de las sesiones (Friedman= 90, 6 gl, $p < 0.001$) (Fig. 12A).

Las hembras SE, con cinco sesiones de cópula previas, muestran un CL significativamente mayor en la 6ª sesión que las hembras SI en su primera experiencia sexual ($U=124$ $p < 0.001$) (Fig. 12A). Similarmente, se observan diferencias en la 7ª sesión ($KW=18.64$, 2 gl, $p < 0.001$), las hembras SE muestran más altos niveles de receptividad sexual que las SI ($U=12.5$ $p=0.01$) y las hembras SES ($U=5$ $p < 0.001$). Sin embargo, no hubo diferencias entre las SI y SES ($U=19$ $p=0.13$) (Fig. 12B).

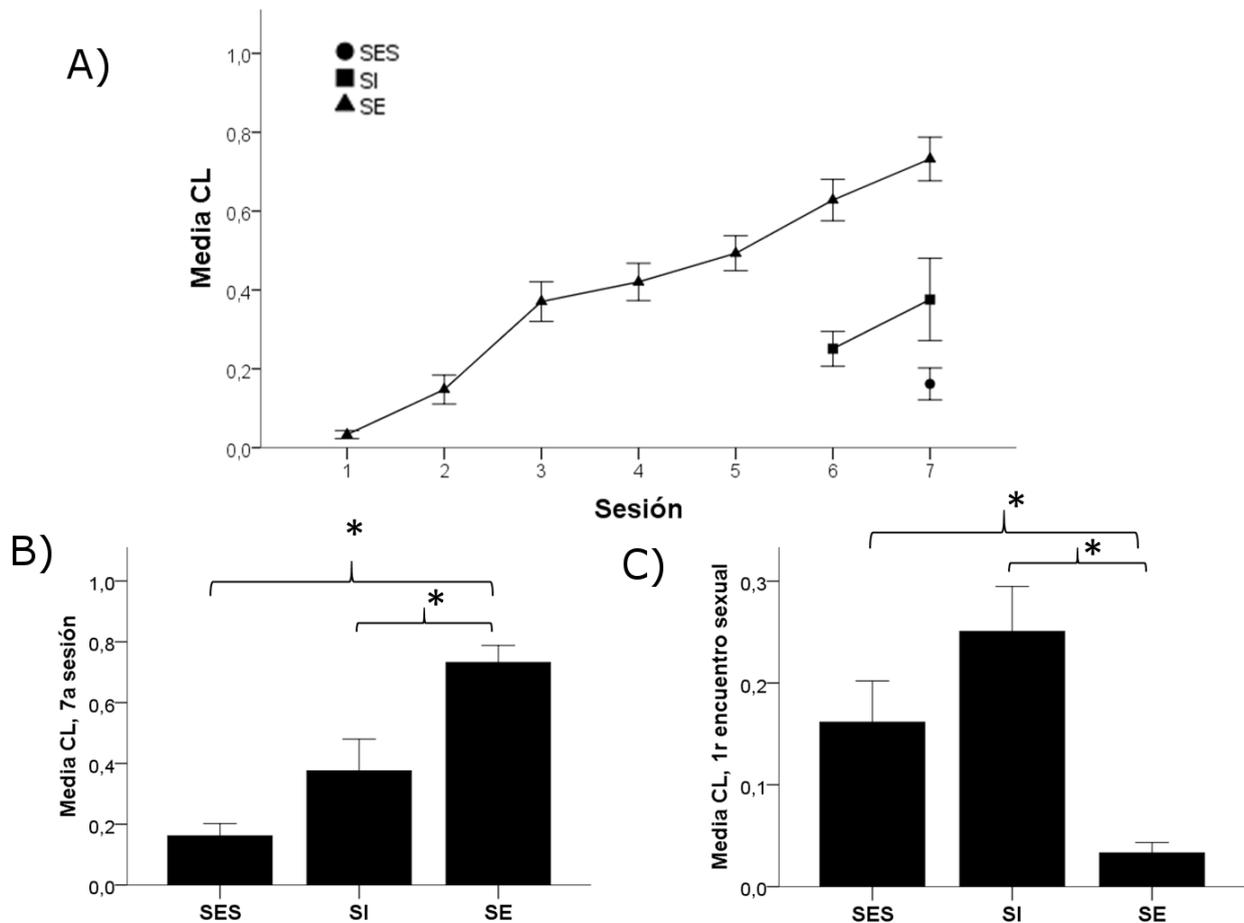


Figura 12. Gráficas de los resultados de conducta sexual de las hembras A) Cociente de lordosis (CL) lo largo de las sesiones de cópula B) CL de la última sesión (la 7ª), donde los grupos difieren en su experiencia sexual previa, C) CL del primer encuentro sexual de cada uno de los grupos (1ª sesión de las SE, 6ª sesión de las SI y 7ª de las SES), donde los grupos difieren en la cantidad de veces que se les trató hormonalmente. * $p < 0.05$

Las hembras del grupo SE muestran como se esperaba un incremento en el CL conforme aumenta su experiencia sexual (A). En la 7ª sesión las hembras SE presentan altos niveles de receptividad en comparación de las hembras SES y SI. Nuestros datos demuestran que cuando se compara el CL en el primer encuentro sexual (C) se observa un efecto del tratamiento hormonal recibido antes de este primer encuentro. Las hembras SI y SES que recibieron 5 y 6 tratamientos hormonales previos respectivamente presentan mayor CL que las SE inyectadas con hormonas por primera vez.

Para evaluar un posible efecto acumulativo del tratamiento hormonal previo al primer encuentro sexual, comparamos la 7ª sesión de las SES (seis tratamientos hormonales previos), la 6ª sesión de las SI (cinco tratamientos hormonales previos) y la 1ª sesión de las SE (sin tratamiento hormonal previo). El análisis estadístico nos demuestra que

existen diferencias entre los grupos (KW= 27.2, 2 gl, $p < 0.001$). Las hembras SE tienen un CL menor en su primer encuentro sexual que las SI ($H=67$ $p < 0.001$) y las SES ($H=117$ $p=0.003$) (Fig. 12C).

Debido a que nuestros datos sugieren que el tratamiento hormonal previo (sin experiencia sexual) facilita la lordosis, incluimos otro grupo de hembras a las cuales se les administró dosis de hormonas 10 veces mayor (10 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ de BE y 100 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ de P) las cuales se denominaron suprafisiológicas (SF). Las hembras de este grupo presentaron en su primera y segunda sesión niveles de CL similares a lo observado en las SE ($U=98.5$ $p=0.5$ y $U=80$ $p=0.2$, respectivamente). Sin embargo, en la 3ª y 4ª sesión, las hembras SF mostraron un CL menor al de las SE ($U=36$ $p=0.01$ y $U=36$ $p=0.005$, respectivamente). Después de la 4ª sesión, algunas de las hembras SF no fueron montadas por los machos durante las pruebas de conducta sexual. De esta forma en la 7ª sesión, solo tres de seis hembras fueron montadas. El análisis del CL de las hembras que fueron montadas demostró que presentaron CL similares al de las hembras SE ($U=12$ $p=0.3$).

9.2.2 Expresión de c-Fos

La expresión de c-Fos fue analizada comparando la presentación de los tres estímulos (aserrín limpio, aserrín con secreciones de macho y cópula) dentro del mismo grupo (comparaciones intra-grupo), y comparando los diferentes grupos con la presentación del mismo estímulo (comparaciones inter-grupos).

A) *Comparaciones intra-grupo*

A.1) Bulbo olfatorio accesorio

Capa glomerular

Se encontraron diferencias significativas en el grupo SI (KW= 8.54, 2 gl, p=0.01). La expresión de c-Fos aumenta cuando se les presenta a las hembras aserrín impregnado con secreciones de macho, en comparación con las hembras que tuvieron el macho disponible para copular (U=0 p=0.008). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre las hembras SES (KW=1.19, 2 gl, p=0.55) ni SE (KW=4.75, 2 gl, p=0.09) (Fig. 13A).

Capa mitral

Se encontraron diferencias significativas en la capa mitral de las hembras SI (KW=6.228, 2 gl, p=0.04). Las hembras expuestas a aserrín de macho mostraron una respuesta de c-Fos reducida en esta capa, en comparación con las hembras que copularon (U=2 p=0.02) (Fig. 12B). No se encontraron diferencias significativas en las hembras SE (KW= 0.11, 2 gl, p=0.95) o SE (KW=5.24, 2 gl, p=0.07) (Fig. 13B).

Capa granular

No se encontraron diferencias significativas en las hembras SES (KW=0.39, 2 gl, p=0.82), SI (KW=4.46, 2 gl, p=0.11) o SE (KW=0.68, 2 gl, p=0.71) (Fig. 13C).

A.2) Área preóptica medial

En esta área no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los grupos: SES (KW=0.39, 2 gl, p=0.82), SI (KW=1, 2 gl, p=0.61) y SE (KW=2.95, 2 gl, p=0.23) (Fig. 13D).

A.3) Hipotálamo ventromedial

Se encontraron diferencias en el grupo de hembras SE (KW=7.24, 2 gl, p=0.03). Se observó una respuesta c-Fos mayor en las hembras SE que copularon, en comparación de aquellas expuestas a aserrín limpio (U=12 p=0.01), pero no comparado con aquellas expuestas a aserrín impregnado con secreciones de macho (U=24 p=0.44). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el grupo SI (KW=2.67, 2 gl, p=0.26) o en el SES (KW=0.39, 2 gl, p=0.82) (Fig. 13E).

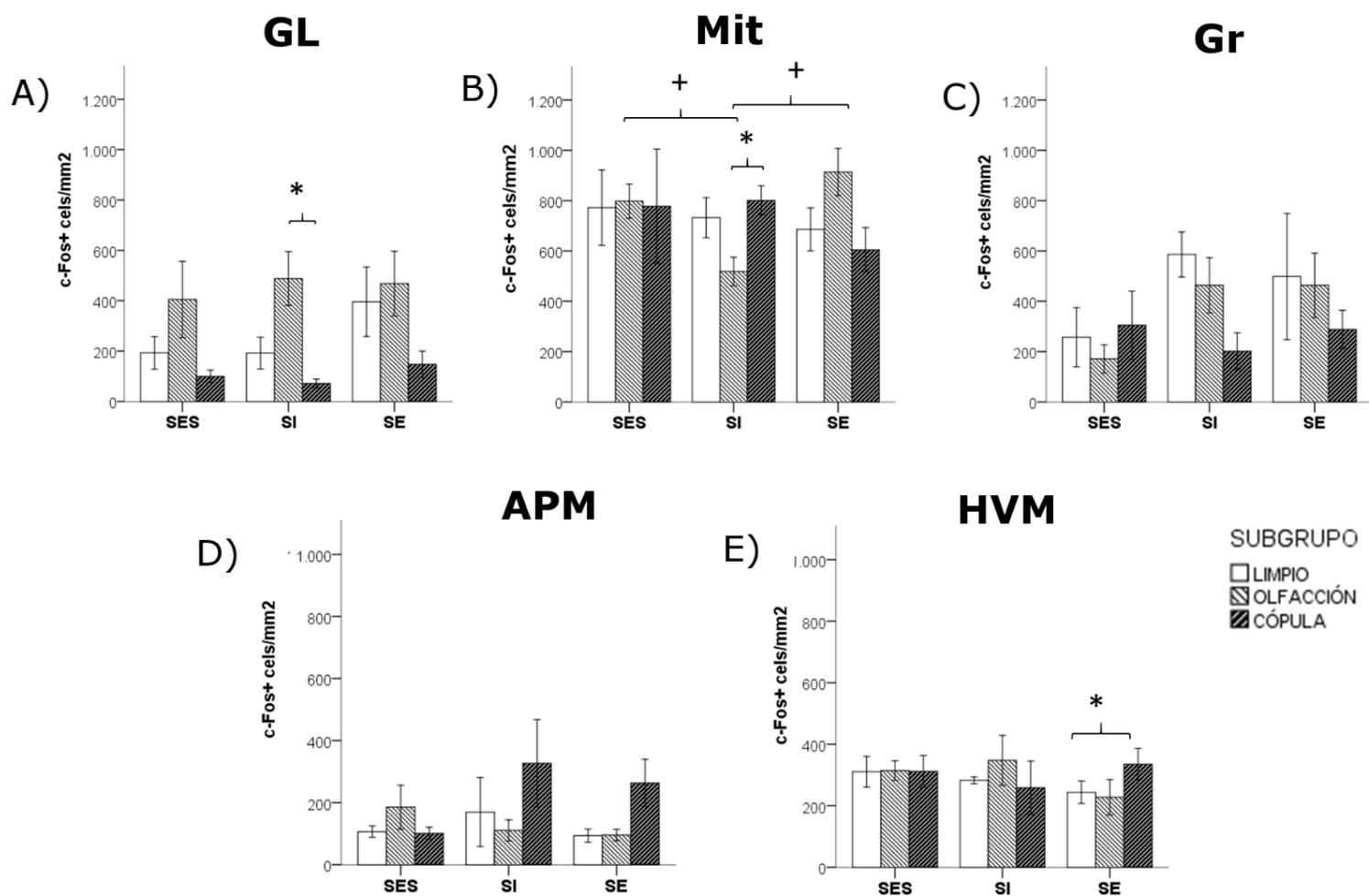


Figura 13. Gráficas que muestran el número de células c-Fos positivas (c-Fos+) por mm² en cada una de las áreas de interés. Las hembras SI que copularon presentan un decremento de la expresión de c-Fos en la capa glomerular del BOA, comparado con las hembras expuestas a aserrín de macho (A). La capa mitral, se observa un incremento en c-Fos en hembras SI que copularon, comparándolas con las hembras expuestas a aserrín de macho (B). Las hembras SE tienen un incremento en c-Fos en el HVM cuando copulan, en comparación a las hembras expuestas a aserrín limpio (E). No se encontraron diferencias significativas en la capa granular del BOA (C) y el APM (D). Las comparaciones entre grupos presentados con el mismo estímulo indican que las hembras SI expuestas a aserrín de macho muestran un decremento de la respuesta c-Fos en la capa mitral, en comparación a las hembras SES y SE (B). Datos representados como la media±ES. *p <0.05 en las comparaciones dentro del mismo grupo, +p<0.05 en las comparaciones entre grupos presentados con el mismo estímulo.

B) *Comparaciones inter-grupo*

Las comparaciones entre los grupos presentados con el mismo estímulo muestran diferencias en la capa mitral del BOA. Se encontraron diferencias significativas cuando las hembras fueron expuestas a aserrín de macho (KW=6.74, 2 gl, p=0.03). Las hembras SI presentaron una respuesta de c-Fos menor que las SE (U=8 p=0.03) y las SES (U=8 p=0.03). No se encontraron diferencias en el resto de las estructuras (Fig. 13B).

C) *Correlaciones entre la conducta sexual y la expresión de c-Fos*

El CL de las últimas sesiones de cópula muestra una correlación positiva entre el número de células c-Fos positivas en la capa mitral del BOA en el grupo de hembras SI ($\rho=0.584$ p=0.019), y en el grupo de SE ($\rho=0.58$ p=0.04). No se encontraron correlaciones entre las otras regiones cerebrales.

9.2.3 Sinaptofisina

A) *Bulbo olfatorio*

Para obtener un control de la fluorescencia de fondo del BO, se utilizó la señal de fluorescencia del tracto anterior intrabulbar (Aci), para determinar que esta estructura es apropiada se comparó el valor de la media de su fluorescencia entre los tres grupos. Como era esperado el Aci no presenta diferencias significativas entre los grupos (KW= 4.3, 2 gl, p=0.12) por lo que es apropiado su uso como control de la fluorescencia de fondo y permite la normalización los datos de sinaptofisina. Para el análisis de esta proteína, se calculó el promedio de las diferentes capas del BOA y del BOP y se normalizó

con el valor de Aci, para determinar el cambio en la fluorescencia de las estructuras neuronales a evaluar con respecto a la fluorescencia de fondo (representada por el valor medio de Aci).

B) Bulbo olfatorio principal

No se encontraron diferencias significativas en el BOP en la expresión de sinaptofisina en ninguna de las tres capas; glomerular ($F_{(2,28)}=0.05$ $p=9.4$), mitral ($F_{(2,28)}=0.44$ $p=0.65$), y granular ($F_{(2,28)}=0.03$ $p=0.97$). Tampoco se encontraron diferencias tomando las tres capas en conjunto del BOP ($F_{(2,28)}=0.16$ $p=0.85$) (Fig. 14).

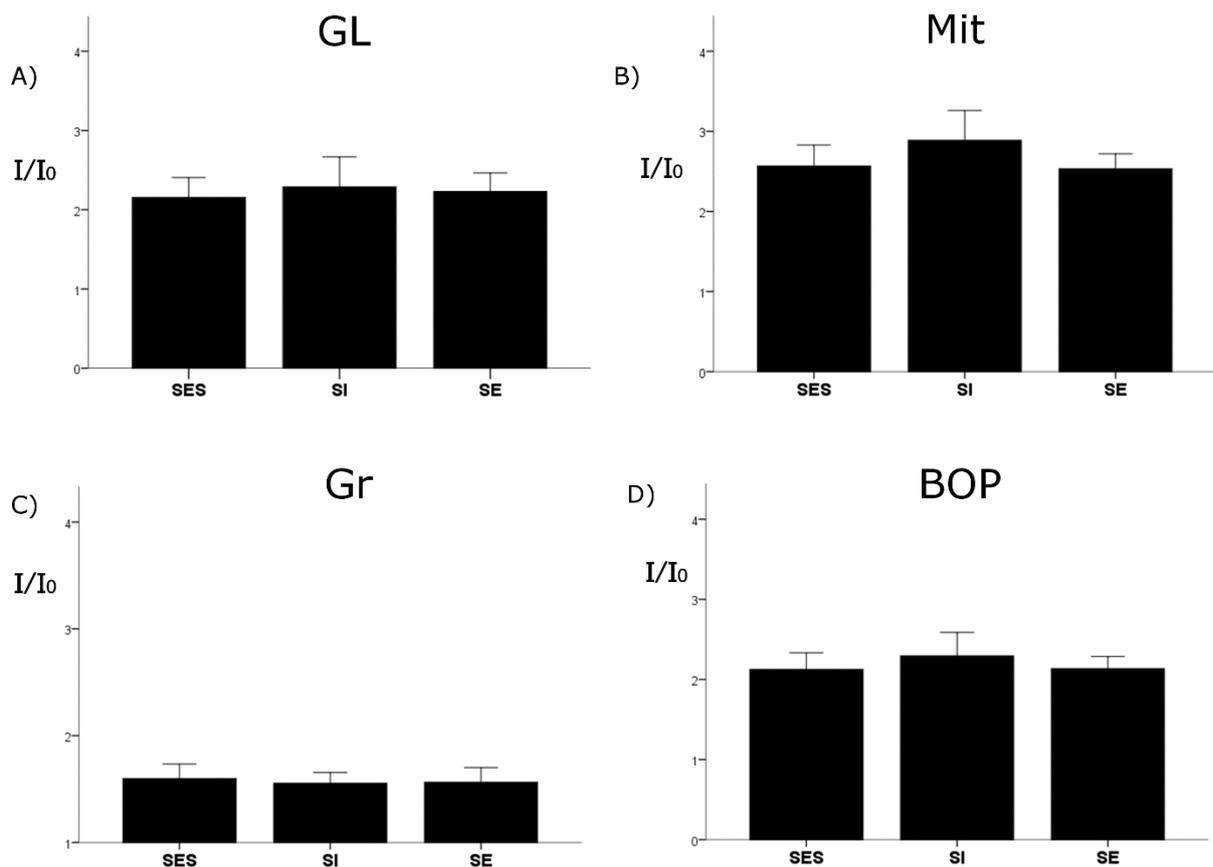


Figura 14. Gráficas representado los resultados de la expresión de sinaptofisina (relativa a Aci) de cada una de las capas del BOP. A) GL, B) Mit, C) Gr y D) valor de las tres capas. El valor representado es el resultado del índice (valor medio de intensidad estructura de interés/ valor medio intensidad Aci).

Los datos demuestran la ausencia de cambios en la expresión de sinaptofisina en el BOP.

En el BOA encontramos diferencias en la capa GL (KW=15.39, 2 gl, $p < 0.001$), las hembras SE presentan una mayor expresión de sinaptofisina que las SES (U=5 $p=0.003$) y SI (U= 0 $p=0.002$). Las hembras SES muestran una mayor expresión de sinaptofisina en comparación a las hembras SI (U=3 $p=0.02$) (Fig. 15).

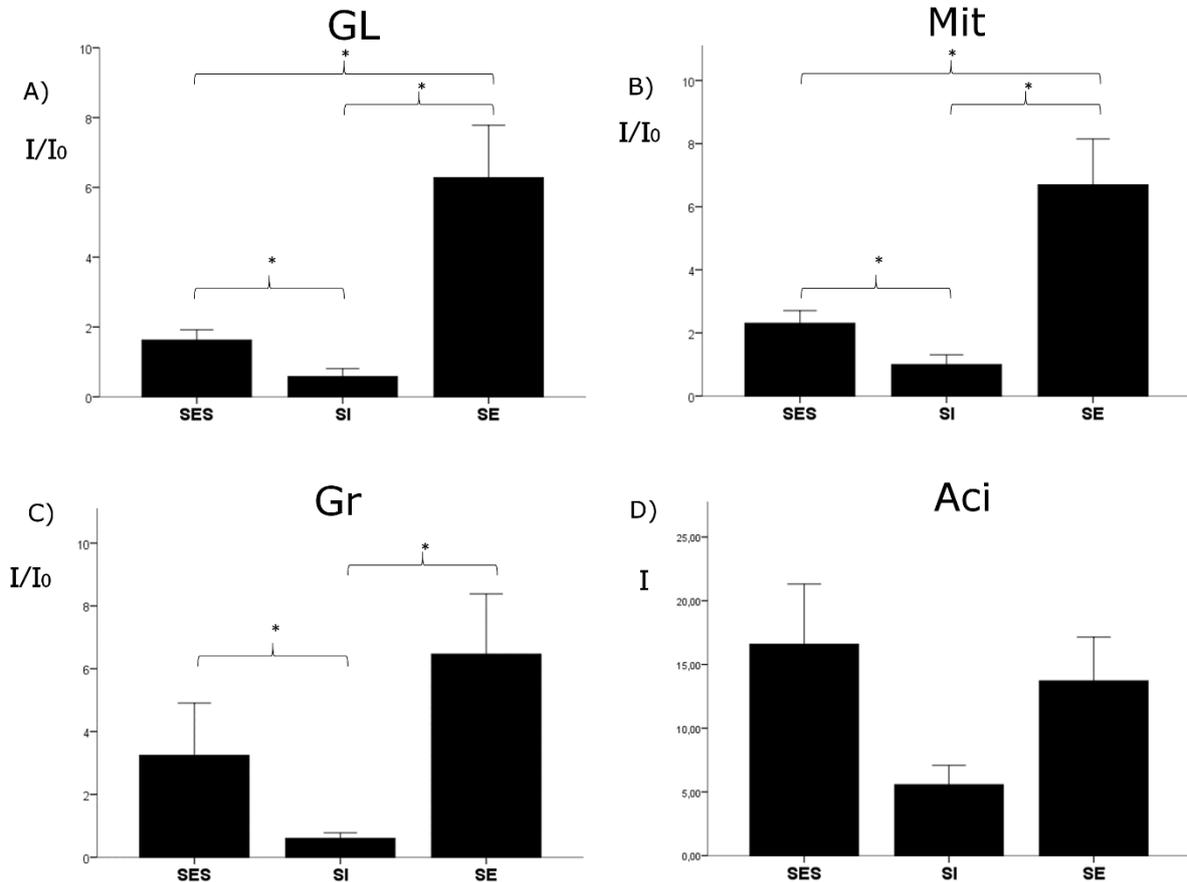


Figura 15. Gráficas representado los resultados de la expresión de sinaptofisina de cada una de las capas del BOA y de Aci. A) GL, B) Mit, C) Gr y D) Aci. El valor representado es el resultado del índice (valor medio de intensidad estructura de interés/ valor medio intensidad Aci). A excepción de la gráfica de Aci (D), donde representamos la intensidad media adquirida en esta estructura que usamos para la normalización del resto de estructuras * $p < 0.05$.

Los datos demuestran la disminución de la expresión de sinaptofisina de las hembras SI en cada una de las capas del BOA (A, B y C) con respecto a las hembra SES y las SE. A excepción de la capa Gr (C), se observa un aumento significativo de la expresión de sinaptofisina en las hembras SE en comparación con las SES (A y B).

Diferencias significativas fueron encontradas en la capa mitral (KW=14.97, 2 gl, $p=0.001$). Nuevamente las hembras SE muestran un incremento en la expresión de

sinaptofisina en comparación con las hembras SES (U=20 p=0.008) y SI (U= 1 p=0.001). También se encontró un incremento en esta proteína en las hembras SES con respecto a las SI (U=10 p=0.030) (Fig. 15).

En cuanto a la capa granular se encontraron diferencias significativas entre los grupos (KW=10.967, 2 gl, p=0.004). Las hembras del grupo SES mostraron mayor expresión de sinaptofisina que las SI (U=6 p=0.032) y las SE un incremento con respecto a las SI (U=1 p=0.002). No se encontraron diferencias entre SES y las SE (U=17 p=0.125) (Fig. 15).

D) Regiones centrales involucradas en la modulación de la conducta sexual femenina (APM, HVM y Me)

No se encontraron diferencias entre los grupos de hembras en la expresión de sinaptofisina en el APM ($F_{(2,24)}=0.18$ p=0.84), el HVM (KW=0.142, 2 gl, p=0.94) o Me (KW=4.0.38, 2 gl, p=0.133) (Fig. 16).

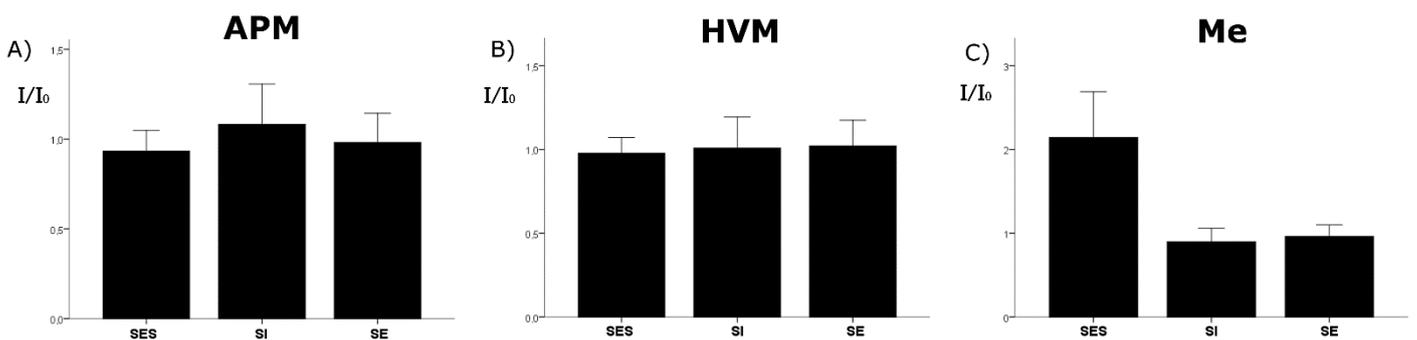


Figura 16. Graficas representado los resultados de la expresión de sinaptofisina en el APM (A), HVM (B) y Me (C). El valor representado es el resultado del índice (valor medio de intensidad estructura de interés/ valor medio intensidad Aci), en todas las gráficas.

Los datos demuestran la ausencia de cambios significativos en la expresión de sinaptofisina en el APM, el HVM y la Me.

10. **Discusión**

10.1 Efecto de la experiencia sexual y el tratamiento hormonal en el ratón hembra

Nuestros datos conductuales corroboran el hecho de que la experiencia sexual es requerida para desplegar altos niveles de receptividad sexual en las hembras de ratón CF1, tal como ha sido demostrado en otras cepas (Portillo et al 2016, Thompson & Edwards 1971). Este aumento en receptividad sexual no depende solamente del tratamiento hormonal, ya que las hembras con el mismo tratamiento con BE y P, pero sin (SES) o con una experiencia sexual previa (SI) mostraron un CL significativamente menor que las hembras SE.

El tratamiento repetido de BE y P tiene un efecto menor sobre la receptividad sexual. Cuando comparamos la primera prueba de conducta sexual entre las hembras SES y SI (con 6 y 5 sesiones previas de tratamiento hormonal respectivamente) con el de las hembras SE sin ningún tratamiento hormonal previo, encontramos que las hembras SI y SES presentan un CL mayor que las hembras SE en su primera experiencia sexual. Esto indica que la repetida administración hormonal puede tener un efecto modesto en la receptividad sexual de las hembras. A pesar de que no encontramos datos en la literatura de la vida media del estradiol en ratones, nuestro tratamiento simula un ciclo estral más largo que el ciclo natural del ratón hembra, lo cual debería asegurarnos la reducción de la concentración de estas hormonas al menos hasta niveles biológicamente inactivos. Para asegurar que el efecto observado en las ratonas SI y SES no es debido a la bioacumulación de hormonas en el plasma se agregó otro grupo al análisis conductual, las hembras suprafisiológicas (SF).

El grupo de hembras SF consistió en hembras tratadas con 10 µg/ratón de BE y 1 mg/ratón de P. Este grupo nos muestra que en las primeras sesiones de cópula no existe un incremento significativo en el CL con respecto al grupo de hembras SE, esto sugiere que una dosis aguda de hormonas no es suficiente para incrementar la receptividad sexual en el primer encuentro sexual. Lo que nos permite descartar que los cambios en la conducta de las hembras SI y SES sean únicamente debidos a una sobredosis hormonal.

Durante la conducta sexual la hembra además de recibir estimulación vagino-cervical es estimulada por las feromonas del macho (Halem et al 2001a, Halem et al 1999, McCarthy et al 2018). MacCarthy y colaboradores (McCarthy et al 2018) reportaron que los ratones hembra ovariectomizadas que reciben reemplazo hormonal y fueron expuestas 4 ó 5 veces a aserrín impregnado con feromonas de macho no despliegan altos niveles de receptividad sexual cuando copulan con machos sexualmente activos. Estos estudios enfatizan en que la estimulación vaginal, pero no la sola exposición a feromonas es fundamental para inducir altos niveles de receptividad sexual en el ratón hembra. Cabe destacar que en rata se ha estudiado el papel de la estimulación somatosensorial que realiza el macho sobre la hembra en la región abdominal, perineum, la grupa, el tórax dorsal, los flancos y la base de la cola (Kow et al 1979, Pfaff et al 1977), estos estudios demuestran la relevante función de esta estimulación. Estos trabajos también relacionan la sensibilidad a estos estímulos con la dosis de estradiol administrada, siendo esta hormona requerida para la expresión de lordosis y con un efecto sensibilizador al estímulo somatosensorial en estas zonas. Pfaff (1977) describe en su

estudio que el estímulo somatosensorial con mayor efecto desencadenante de la lordosis es la presión en los flancos y a su vez presión en la grupa.

En nuestro conocimiento, este tipo de estudios no se ha realizado en el ratón, esto se debe probablemente a las diferencias entre estas especies en la receptividad sexual en su primer encuentro sexual, así como su respuesta a estradiol y progesterona. La rata hembra presentan alta receptividad sexual con tan solo el tratamiento hormonal, mientras que los ratones requieren de dicho tratamiento más la experiencia sexual para mostrar altos niveles de receptividad sexual (Bonthuis et al 2011, Thompson & Edwards 1971). Por otra parte, a pesar de que la ejecución de la lordosis por estimulación somatosensorial, aplicada por el experimentador ha sido ampliamente reportado no parece haber literatura reciente con una perspectiva cuantitativa que relacione la intensidad del estímulo somatosensorial necesaria para la ejecución de lordosis. Kow y Pfaff (1979) publicaron un estudio de esta índole, pero la metodología utilizada deja algunas incógnitas. Una de ellas es la metodología para demostrar que las hembras eran capaces de realizar lordosis previamente al estudio (¿fueron estimuladas antes? ¿de qué modo?), si las hembras del experimento contaban con experiencia sexual implica que pueden haber asociado estímulos de otras modalidades a la estimulación somatosensorial. Otro aspecto cuestionable es el uso del fármaco reserpina como sedante para facilitar la manipulación del animal, dado que además de inmovilizarlas los autores reportan que el fármaco facilita la expresión de lordosis. El efecto facilitador de la reserpina se ha atribuido a la actividad de depleción de monoaminas, las cuales mimetizan el efecto de la progesterona (48h posterior a la administración de estradiol) en la ejecución del reflejo de lordosis (Meyerson 1964). En el ratón hembra se requieren

estudios que evalúen los efectos de la estimulación de los flancos, la grupa y la base de la cola, sobre la facilitación de la receptividad sexual.

Hasta la fecha se desconocen los mecanismos de plasticidad neuronal mediante los cuales la experiencia sexual incrementa la receptividad sexual. Se ha propuesto que la experiencia sexual podría potenciar los efectos producidos por las hormonas sexuales, y siguiendo esta línea, Bonthuis y colaboradores (Bonthuis et al 2011) propone que la experiencia sexual induce cambios en la transcripción del ADN teniendo como mediador de estos la desacetilación de histonas. Esto fue demostrado con el uso de butirato de sodio (un inhibidor de la acetilación de histonas), el cual tiene un efecto potenciador de la experiencia sexual (Bonthuis et al 2011). Sin embargo, en esta hipótesis no se plantea porque el estradiol puede tener diferentes efectos en función de una dosis aguda o diversas dosis menores repetidas, como se ha detectado en otros estudios (Uphouse et al 2015).

Se ha reportado que las ratas hembra sin experiencia sexual presentan latencias de aproximación al macho mayores que las hembras sexualmente expertas, esto se atribuye al hecho de que a las hembras sin experiencia sexual la presencia del macho les induce estrés (Meerts et al 2016). Las hormonas ováricas tienen propiedades ansiolíticas (Brot et al 1995, Uphouse et al 2014, Uphouse et al 2015, Walf & Frye 2005a, Walf & Frye 2005b). Por ejemplo, las hembras en proestro muestran bajos niveles de ansiedad en relación con las hembras en diestro (Marcondes et al 2001). De manera similar, en las hembras ovariectomizadas el tratamiento de BE y P reduce los niveles de ansiedad (Arnold et al 2019, Nyuyki et al 2011). El efecto ansiolítico del BE depende de la

activación del receptor de estradiol beta (Oyola et al 2012, Walf & Frye 2005b). Se ha propuesto que la experiencia sexual puede generar una adaptación a la respuesta de estrés, incluso al estrés propiamente inducido por la cópula (Arnold et al 2019). De esta forma, Uphouse y colaboradores, demostraron que el tratamiento repetido con BE mediante cuatro inyecciones de 10 μg (una por semana) tiene un efecto protector de la conducta de lordosis después de la exposición a un estresor (inmovilidad), es decir tras un estímulo estresante la conducta de lordosis se ve reducida, pero con dicho tratamiento hormonal esta reducción es menos acusada. Por otro lado, una sola dosis de 40 μg de BE no tiene dicho efecto protector, resultando en la reducción de la receptividad sexual después de la exposición al estresor (Uphouse et al 2015). Los mecanismos de acción concretos para este efecto ansiolítico del estradiol son aún desconocidos. Una posible vía es la activación de los receptores beta de estradiol. Pues ha sido demostrado que la activación de este receptor con un agonista selectivo (diarilpropionitrilo) reduce comportamientos relacionados con la ansiedad evaluados con el pruebas de campo abierto y el laberinto elevado en forma de cruz (Lund et al 2005), siendo además este efecto inhibido con la administración de tamoxifeno, un antagonista de los receptores a estrógenos (Lund et al 2005).

Otro posible mecanismo es el efecto que tiene el estradiol sobre la progesterona y su receptor. Uphouse y colaboradores (2014 y 2015), sometieron a las ratas hembra a un estresor moderado (inmovilidad) reportando que después del estímulo estresante se reduce el número de lordosis desplegadas por la hembra. Este efecto inhibitorio en la lordosis decrece si a las ratas se les administra 10 μg de estradiol por semana por 1-3 semanas previo al estresor. No obstante, dicho efecto protector se pierde si se

discontinúa el tratamiento por tres semanas. A partir de estas observaciones, Uphouse hipotetiza que el efecto observado podría deberse al papel que juega el estrógeno en el incremento de la síntesis de la 3β -hidroxisteroide deshidrogenasa, enzima encargada de transformar el precursor pregnanolona a progesterona. Posteriormente demuestra que el efecto protector de la lordosis tras la inmovilidad solo se presenta con un tratamiento hormonal continuado (10ug estradiol por semana, durante cuatro semanas) y no en inyecciones agudas con (única inyección de 40 μ g de estradiol). En este estudio además demostró que la administración de RU486, un antagonista del receptor extracelular de progesterona, aumenta el efecto inhibitor sobre la lordosis en las hembras con inyecciones agudas mientras que no tuvo efecto sobre las hembras tratadas crónicamente con dosis más bajas de estradiol (10 μ g). Este resultado le lleva a proponer que dicho efecto anti estresor crónico podría recaer sobre el receptor intracelular de progesterona (Uphouse et al 2015).

Por otra parte, Bitran y colaboradores atribuyen el efecto ansiolítico de la progesterona a su metabolización mediante la enzima 5α -reductasa a alopregnanolona. Dado que un inhibidor de esta enzima, el N,N-dietil-4-metil-3-oxo-4-aza- 5α -androstano-17 β -carboxamida (4-MA), elimina el efecto ansiolítico en ratas (evaluado en laberinto elevado en forma de cruz) (Bitran et al 1995). Además, Bitran propone que la alopregnanolona potencia la respuesta mediada por receptores GABBA_a, pues describe un aumento del influjo de Cl⁻ en sinaptoneurosomas corticales procedentes de hembras tratadas con progesterona. Este flujo se reduce con la administración de 4-MA.

Por lo anterior, proponemos que las hembras SES y las SI pudieran ser más receptivas en su primer encuentro sexual debido a la reducción de ansiedad que el repetido tratamiento hormonal les otorga. Este efecto ansiolítico probablemente no se observa en la primera sesión de cópula de las hembras SF, dado que como ha sido demostrado por Uphouse (2015), una dosis aguda de BE no protege de la inhibición de la lordosis causada por estrés, como si lo hacen las dosis crónicas (Uphouse et al 2015).

Los resultados de los estudios de Bonthuis (2011) y Uphouse (2014, 2015), se pueden ver reflejados en nuestros datos. De ese modo encontramos, tal como reporta Bonthuis, un aumento de la receptividad sexual de las hembras con mayor experiencia sexual en el grupo SE; donde podemos ver dicho incremento a lo largo de las sesiones. Por otro lado, las hembras SI y SES presentan un CL mayor en su primer contacto con un macho, después de tratamientos hormonales constantes (6 y 7 respectivamente); que su contrapartida en las hembras SE, en su primer contacto sexual y a su vez primer tratamiento hormonal. Esto nos sugiere un efecto de las hormonas que hipotetizamos podría deberse a un menor estrés frente al macho, en concordancia con lo propuesto por Uphouse. A su vez las hembras del grupo SF no presentan mayor CL que las hembras SE en su primer contacto sexual, hecho que apoyaría los reportes de Uphouse sobre la insuficiencia de una dosis aguda de hormonas para reducir el estrés (Uphouse et al 2015).

10.2 La facilitación de la lordosis puede implicar cambios en la activación neuronal

Nuestros resultados demuestran que la experiencia sexual es necesaria para incrementar la receptividad sexual en el ratón hembra. Esto sugiere algún tipo de

cambio plástico en las regiones neuronales implicadas en la regulación de la postura de lordosis, dado que las hembras cambian su respuesta al mismo estímulo. En este trabajo evaluamos el efecto de la experiencia sexual en la actividad del BOA, el APM y el HVM.

Varios estudios que evalúan actividad neuronal en respuesta a estímulos sexualmente relevantes no especifican si la hembra copuló con uno o varios machos. Además, los estudios que evalúan la actividad neuronal en respuesta a feromonas de machos, el estímulo suele provenir de varios sujetos (a veces de hasta 10 individuos) al combinar ya sea su orina o el aserrín donde habitaron e impregnaron de feromonas (Halem et al 2001a, Taziaux & Bakker 2015). En nuestro estudio, las hembras copularon siempre con el mismo macho asignado desde el inicio; y para el grupo de hembras expuestas al aserrín de macho, se usó el aserrín del macho con el que habían copulado antes. Este procedimiento se escogió porque las hembras de ratón suelen interactuar sexualmente con tan solo un macho a la vez en condiciones naturales. Los ratones macho son muy agresivos hacia otros congéneres del mismo sexo, los machos adultos dominantes defienden su territorio, alejando otros machos y generalmente solo copulan con las hembras presentes en su territorio (Bronson 1979, Hurst & Beynon 2004, Rich & Hurst 1998).

Los límites territoriales se establecen con señales urinarias, de esta forma los machos dominantes en condiciones de laboratorios producen hasta 500 emisiones de orina por hora y 3000 por noche. Este comportamiento es virtualmente nulo en machos subordinados (Desjardins et al 1973, Maruniak et al 1975). Por esta razón la mezcla de aserrín impregnado con las feromonas procedente de varios machos no es

representativo de la condición natural, ni siquiera en poblaciones de alta densidad (Bronson 1979). Bajo condiciones de laboratorio, el estabulamiento en grupo de los ratones macho puede llevar a un ambiente de estrés, cuando los machos adquieren experiencia sexual se vuelven altamente agresivos hacia otros machos (Annas et al 2013, Goyens & Noirot 1975, Van Loo et al 2001), esto representa un problema para el bienestar animal, y representa un inconveniente si se quiere obtener una mezcla de orina generada mediante cohabitación.

Además, la mezcla artificial de varias orinas (de machos estabulados individualmente, pero mezclados con posterioridad ya sea directamente o utilizando un sustrato) representa el dilema de la interpretación de la hembra de dicha mezcla. De esta forma, Rich y Hurst estudiaron la competencia del marcaje de orina entre machos y cómo la hembra modifica su preferencia en función del contramarcaje de otros machos. Estos estudios demostraron que la hembra prefiere al macho que logra aislar otros machos y por ende evita el contramarcaje con respecto a los machos en los cuales sus territorios son contramarcados. Las hembras prefieren a los machos contramarcadores (los que marcan otro territorio) a los contramarcados (aquellos a los que les marcan otro macho su territorio) (Rich & Hurst 1998, Rich & Hurst 1999). Por lo que una mezcla de orina puede llevar a una inadecuada interpretación de los datos a la vez de no ser representativa de las condiciones naturales.

En nuestro estudio, las hembras copularon siempre con el mismo macho con la finalidad de ser consistente con el estímulo presentado, aunque las hembras en la naturaleza podrían encontrarse con diferentes machos durante su periodo receptivo es muy poco

plausible, debido a la agresividad y territorialidad de los machos (Bronson 1979). También, la mezcla de orina de varios machos representa una variable que puede modificar los resultados y por ello se optó por controlar la procedencia de la orina de un solo macho, en este caso del sujeto con el que la hembra copuló. Además, se ha demostrado que la familiaridad de la orina del macho tiene un efecto sobre la actividad neuronal del BOA (Halem et al 2001a).

De esta forma nuestros resultados de la actividad neuronal demuestran que, en la capa glomerular del BOA, las hembras SI exhiben un incremento en el número de células c-Fos positivas cuando son expuestas a feromonas de macho en comparación a las hembras que copulan. Las células glomerulares son principalmente GABAérgicas/dopaminérgica (Nagayama et al 2004, Wachowiak & Shipley 2006), estas neuronas reciben y regulan la información feromonal proveniente de las neuronas del órgano vomeronasal. Por ello, un incremento de la actividad de las neuronas glomerulares puede estar relacionada con la habilidad de las SI de crear una memoria olfativa de la identidad feromonal de su compañero sexual.

Otra explicación del porqué las hembras SI que copulan muestran bajos niveles de c-Fos en comparación a las expuestas a las feromonas del macho podría ser debido a que las hembras que copulan pueden explorar menos las feromonas no volátiles del macho que se encuentran en el aserrín debido a la presencia de otras señales sensoriales provistas por el cómo feromonas volátiles, las cuales son detectadas principalmente por el BOP (Hurst & Beynon 2004, Lanuza et al 2014) o que la presencia del macho represente un elemento distractor que impida la exploración del aserrín, al menos tanto como lo haría

la hembra en solitario en la caja; reduciendo el tiempo disponible para realizar dicha exploración mediante el bombeo vomeronasal o disminuyendo la motivación de la hembra en realizar dichas acciones. Merece la atención también explicar que la presencia del macho en la misma caja no solo implica un elemento distractor que modifique o altere directamente la actividad de ciertas modalidades sensoriales como lo son la olfacción. La presencia del macho conlleva a la estimulación de otras modalidades sensoriales como la visual, auditiva y somatosensorial, que indirectamente podrían estar alterando la actividad de las áreas cerebrales principalmente relacionadas en la codificación de señales feromonales o conducta sexual (Sokolowski & Corbin 2012). Además, la presencia del macho puede alterar la disponibilidad y accesibilidad de las feromonas. Un ejemplo de ello podría ser el de los sesquiterpenos E,E,- α -farneseno y E- β -farneseno, sustancias volátiles con efecto atractivo para las hembras que ya han adquirido experiencia sexual (Jemiolo et al 1991). Estos compuestos a pesar de encontrarse en orina del macho son segregados por la glándula prepuccial (Jemiolo et al 1991). Por lo que la presencia del macho alteraría la concentración disponible de estos compuestos, ya que la hembra es expuesta a concentraciones mayores de estos a través de la exploración ano-genital del macho.

Otra posible explicación es que los bajos niveles de receptividad sexual causan una reducción de la actividad neuronal cuando las hembras copulan.

En cuanto a la capa mitral del BOA, encontramos que las hembras SI presentan cambios en la expresión de c-Fos, nuestros datos muestran una reducción en la actividad

neuronal en los ratones hembra expuestas a aserrín de macho en comparación a las hembras que copularon (Fig. 13B).

En el ratón hembra, las células mitrales responden específicamente a las feromonas de su compañero sexual y se ha reportado que estas pueden generar un aumento a largo plazo en el número de sinapsis con las células granulares las cuales son mayoritariamente inhibitorias (Brennan et al 1990).

Este incremento de la inhibición de las células granulares hacia las mitrales, es un mecanismo implicado en el reconocimiento de la pareja sexual. La formación de una memoria por la pareja sexual se puede evaluar con el efecto Bruce, el cual consiste en que las hembras después de copular forman una memoria de su pareja sexual. Si durante los primeros días de gestación la hembra es expuesta a feromonas de un macho con el cual no copuló, la hembra aborta (Bruce 1959). Brennan y colaboradores demostraron que el bloqueo de la inhibición GABAérgica mediante la administración de bicuculina inhibe el efecto Bruce ya que las hembras gestantes al ser expuestas a un macho con el que copuló abortan (Brennan et al 1990, Brennan & Binns 2005).

Además de la inhibición descrita anteriormente donde solo se implica el circuito local del BOA, este también recibe inervación de otras estructuras. Fan y Luo (2009) describen dos rutas de retroalimentación del núcleo de la cama de la estría terminal y de la AMG hacia el BOA (Fan & Luo 2009). Estas proyecciones del núcleo de la cama de la estría terminal se caracterizaban por llegar a la capa mitral del BOA, ser GABAérgicas y proceder de somas con receptores de estrógeno alfa, este dato anatómico nos aporta

otro posible mecanismo de inhibición sobre las células mitrales del BOA con relación a la conducta sexual, que podría estar relacionado con nuestros resultados.

Nuestros resultados concuerdan con los estudios de Brenna y Binns en los cuales usando microdiálisis *in vivo* en hembras con previa experiencia sexual, demostraron un incremento en la inhibición mediado por GABA en el BOA en respuesta a las feromonas de su pareja sexual (Brennan & Binns 2005). De forma similar, Gao y colaboradores, usando una aproximación de electrofisiología *ex-vivo* combinada con inmunofluorescencia, encontraron que las células mitrales del BOA, que se activaron en el momento en que las hembras copulan (positivas a c-Fos) muestran una reducción en su excitabilidad al ser repetidamente estimuladas llegando a no generar respuesta si las hembras son expuestas a las feromonas de su compañero sexual (Gao et al 2017).

En su artículo Gao define esta silenciación específica como un proceso de metaplasticidad, por ser un mecanismo intrínseco de la propia célula, no dependiente de la silenciación por parte de otras neuronas (Gao et al 2017, Nanda et al 2017). Este fenómeno podría también explicar nuestros resultados de las hembras SI en la capa mitral ya que en estas observamos una menor activación cuando copulan que cuando solamente son expuestas al aserrín del macho. Estas hembras SI pudieran presentar esta silenciación de las neuronas mitrales descrita por Gao. Otra posible explicación a la reducción de la activación de las células mitrales al ser presentadas con feromonas de un macho familiar es la propuesta por los grupos de investigación de Xu y van der Linden (van der Linden et al 2018, Xu et al 2016) quienes describen un mecanismo plástico “use it and lose it” (úsalo y piérdelo) en el OVN. De esta forma reportan que en ratones macho

que fueron expuestos a hembras por largos periodos de tiempo muestran una reducción en la respuesta específica de aquellas neuronas del OVN responsivas a las feromonas de la hembra (Xu et al 2016). Esta regulación hacia abajo de la activación de c-Fos también ha sido reportada en ratones macho ante la estimulación de feromonas de crías en el OVN, de esta forma los machos que son padres presentan menor sensibilidad y expresión de c-Fos en respuesta a las feromonas de las crías que los machos sin experiencia sexual (Tachikawa et al 2013).

Nuestros resultados contradicen el estudio de Halem y colaboradores. Este grupo de investigación reportó que las hembras Balb/c gonadalmente intactas en estro y proestro, tras copular una vez muestran un incremento en c-Fos en la capa mitral del BOA, específicamente en la región rostral, en respuesta al aserrín impregnado con secreciones de macho. Estas diferencias pueden deberse a diferencias en la cepa de ratones utilizados, el estado hormonal de las hembras (gonadalmente intactas vs gonadectomizadas en nuestro estudio). En el estudio de Halem y colaboradores no aclaran si las feromonas utilizadas para estimular a las hembras fueron obtenidas del macho con las cuales copularon o de otros animales. Otra diferencia es que Halem y colaboradores realizaron sus estudios en cortes sagitales que les permiten diferenciar entre la región caudal y rostral del BOA, lo cual no es posible analizar en los cortes coronales utilizados en este trabajo.

En nuestro estudio no encontramos diferencias significativas en la activación de capa granular del BOA, a pesar de la importancia de esta capa en la codificación de la señal feromonal (Binns & Brennan 2005, Brennan et al 1990). Halem y colaboradores,

reportaron un incremento de c-Fos en esta capa en ratones hembra expuestas a feromonas de macho en comparación a las expuestas a aserrín limpio, los procedimientos con sus animales fue muy distinto, recolectando aserrín de cinco machos y su protocolo no implicaba hembras con diferente número de experiencias sexuales, eran hembras sin experiencia sexual y tratadas diariamente con BE por tres semanas antes de la prueba de conducta (Halem et al 2001a). La disparidad en estos resultados podría deberse a dicha diferencia de protocolos. Similarmente a nuestros resultados, Corona y colaboradores demostraron que en la rata hembra no hay un incremento en la actividad neuronal de las células nuevas que se integran a la capa granular cuando son expuestas a feromonas del macho, pero si encuentra un incremento en c-Fos en hembras que copulan regulando la interacción sexual (pacing) (Corona et al 2016). La regulación de la cópula es otro factor a tener en cuenta, pues en nuestro protocolo fue el macho quien reguló la cópula. La regulación de la cópula por parte de la hembra tiene varios efectos en las ratas hembras, como incrementar la neurogénesis adulta (Portillo et al 2012) e inducir estados afectivos positivos (Arzate et al 2011). Sin embargo, los efectos de cópula regulada por las hembras no han sido evaluados en ratón.

En cuanto a las correlaciones, nuestros datos muestran una correlación positiva entre el CL en la última prueba conductual de las hembras SI y SE y el número de células c-Fos positivas en la capa mitral del BOA. Esta correlación no se observó en el grupo SN. Estos resultados apuntan a un refinamiento de la respuesta de las células mitrales debido a la experiencia sexual.

La comparación entre grupos presentados con el mismo estímulo nos muestra que las hembras SI tienen una respuesta c-Fos reducida en la capa mitral del BOA en comparación a las SES y las SE (Fig. 13B). Esta diferencia podría explicarse porque las hembras SI pueden estar en el proceso de formar una memoria de su compañero sexual, y en las hembras SE este cambio ya no es detectable.

Las hembras SES y SE no mostraron un incremento en la respuesta de c-Fos al copular. La falta de respuesta del grupo SES podría estar asociada con el hecho de que no estuvieran sexualmente receptivas. En el caso del grupo SE, la repetida experiencia sexual podría haber inducido habituación en la actividad del BOA o la relevancia de dicha estructura probablemente cambie con la experiencia sexual (Keller et al 2006a, Keller et al 2006b). De esta forma se ha reportado que la inhibición temporal del epitelio olfativo con sulfato de zinc ($ZnSO_4$), lleva a la disrupción del comportamiento de lordosis en hembras sin experiencia sexual; sin embargo, en hembras sexualmente expertas la receptividad sexual prevalece después de la administración de sulfato de zinc (Keller et al 2006b). Demostrando que el comportamiento sexual se vuelve menos dependiente de la actividad del BOP con la experiencia sexual.

Las hembras SES no mostraron un aumento en la actividad neuronal en ninguna de las capas del BOA cuando fueron expuestas al aserrín de macho, probablemente porque las feromonas fueron obtenidas de la caja hogar de un solo macho. El aserrín impregnado con las secreciones de varios machos puede tener más feromonas que estimulan al OVN, lo que llevaría a un aumento de la exploración del aserrín para poder discernir las múltiples señales. Como ya se mencionó las hembras interpretan diferente la mezcla de

excreciones provenientes de varios machos que las excreciones de uno solo (Rich & Hurst 1998, Rich & Hurst 1999).

El HVM modula los componentes motivacionales y consumatorios de la conducta sexual femenina en roedores (González-Flores et al 2017). Nuestros datos muestran que las hembras SE tienen un mayor número de células c-Fos positivas cuando copulan en comparación a las hembras expuestas a aserrín limpio. Resultados similares ya han sido reportados en el ratón y la rata hembra, donde la cópula incrementa la actividad neuronal de esta región (Calizo & Flanagan-Cato 2003, Yang et al 2009).

En cuanto al APM no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las comparaciones realizadas. Similarmente, Halem y colaboradores (Halem et al 2001b) reportaron que las hembras gonadalmente intactas que copulan no muestran un aumento en la actividad neuronal del APM, el núcleo de la cama de la estría terminal o la AMG si son expuestas al aserrín de un macho conocido. Estos investigadores concluyen que la cópula genera una memoria del compañero sexual que inhibe la activación neuronal al ser presentadas con el olor del macho conocido ((Halem et al 2001b). Por otro lado, otros autores si han encontrados cambios en la actividad neuronal en estas estructuras, Taziaux y Bakker demuestran que la exposición a aserrín de macho incrementa la expresión de c-Fos en el APM y el HVM en las hembras CD-1 sin experiencia sexual (Taziaux & Bakker 2015). Estas diferencias, como ha sido mencionado anteriormente, pueden ser debidas a la cepa diferente de ratón en ambos estudios y al hecho de que en el trabajo de Taziaux la orina recolectada era de varios machos, las

diferencias pueden deberse también al diferente de grado de experiencia sexual de las hembras en cada estudio.

10.3 Cambios en la expresión de sinaptofisina en respuesta a la experiencia sexual

Nuestros datos demuestran que, en las tres capas del BOA, después de la primera experiencia sexual (grupo SI), se reporta un decremento de la expresión de sinaptofisina con respecto a las hembras SES, posteriormente con la repetida estimulación sexual las hembras SE muestran un incremento en la expresión de esta proteína, llegando a ser significativamente mayor en la capa mitral y glomerular a lo observado en las hembras SES (Fig. 15). Interesantemente la experiencia sexual no modifica la expresión de sinaptofisina en las tres capas del BOP, el APM, el HVM y la Me. Estos resultados sugieren que los cambios en la expresión de sinaptofisina representan una ventana de plasticidad específica del BOA.

Nuestros resultados con sinaptofisina en la capa mitral del BOA, concuerdan con los obtenidos del conteo de c-Fos. Las hembras SI tienen un decremento en la expresión de sinaptofisina y c-Fos en comparación con las hembras SES y SE, sugiriendo que las hembras SI se encuentran dentro de una ventana de plasticidad que implica la remodelación del circuito disminuyendo la actividad de esta capa. En el apartado anterior hipotetizamos que debido a la formación de la memoria olfatoria del compañero sexual la capa mitral del BOA presentará una activación menor. Los datos obtenidos en la expresión de sinaptofisina apoyan una remodelación sináptica específica del BOA, destacando primero una reducción de sinaptofisina posiblemente por un mecanismo de poda sináptica, hecho ya registrado en el BO como la reducción de

espinas dendríticas o relocalización de estas (Hardy & Saghatelian 2017), o la fagocitosis y reducción de sinapsis en la que se implica la actividad de la microglía (Denizet et al 2017).

En la literatura científica no se encuentran estudios similares que den una explicación a nuestros resultados en sinaptofisina en el contexto de la conducta sexual. No obstante, se han observado posibles mecanismos que podrían ser los causantes de estos cambios. Usando estos estudios previos como base, se construyó una serie de hipótesis mutuamente no excluyentes que podrían explicar nuestros resultados de la expresión de sinaptofisina en función a la experiencia sexual (Fig. 17).

A) La disminución en la expresión de sinaptofisina en las hembras SI, se puede deber a una disminución del número de sinapsis por poda neuronal, que conlleva a una remodelación del circuito. De esta forma se ha reportado posibles mecanismos neuronales capaces de modificar las espinas sinápticas, como la formación-eliminación de estas o la relocalización de las espinas ya existentes (Hardy & Saghatelian 2017).

B) Reducción en el número de vesículas presentes en dichas sinapsis. La experiencia sexual conlleva a que la sinaptogénesis se incremente generando una expresión de sinaptofisina mayor que los niveles basales en las SE. Este mecanismo puede involucrar un mayor número de sinapsis y/o mayor número de vesículas por sinapsis. Estudios futuros son necesarios para contestar estas preguntas.

C) La disminución en la sinaptofisina en las hembras SI pudiera no significar una estricta reducción de sinapsis o vesículas, sino que otras proteínas vesiculares con alta redundancia funcional podrían estar sustituyendo a la sinaptofisina, algunas de estas

candidatas podrían ser la sinaptogirina (Janz et al 1999), este decremento sería solo transitorio ya que la sinaptofisina no solo llegaría a los niveles basales, sino que incrementaría aún más su expresión con la experiencia sexual. Aunque, no existen datos en la literatura que apoyen la hipótesis de una disminución transitoria de la sinaptofisina y que su función sea adquirida o rescatada por otra proteína vesicular, ya se ha demostrado la redundancia funcional de estas proteínas vesiculares (Janz et al 1999), o al menos su contingencia en el ciclo de endo-exocitosis vesicular (Eshkind & Leube 1995).

D) El incremento en la poda sináptica puede ser un mecanismo permisivo para la integración de las células nuevas que llegan a través de la corriente de migración rostral. Es decir, para que en el BOA pueda integrar a las células nuevas, las ya presentes e integradas en el circuito deberían remodelar su estructura para permitir la inserción e integración de las recién llegadas a través de la corriente de migración rostral, así como permitir la formación del árbol dendrítico de estas. Tras esta incorporación de neuronas nuevas, un incremento en su supervivencia puede aumentar la expresión de sinaptofisina por el mayor número de neuronas las cuales forman más sinapsis en el BOA. El reconocimiento olfativo de la pareja sexual ya ha sido relacionado con la neurogénesis adulta en el BOA, siendo al parecer este proceso plástico necesario para el reconocimiento de la pareja sexual. Esto fue demostrado por Oboti y colaboradores, donde observaron que la ablación de neurogénesis en la edad adulta provoca que la hembra interrumpa su gestación a pesar de ser expuesta a olores del macho con quien copuló. Es decir, que se da el efecto Bruce en presencia de la pareja sexual debido a que

no se formó una memoria olfatoria de esta. La capa granular del BOA es la estructura principal donde se integran estas células nuevas (Oboti et al 2011).

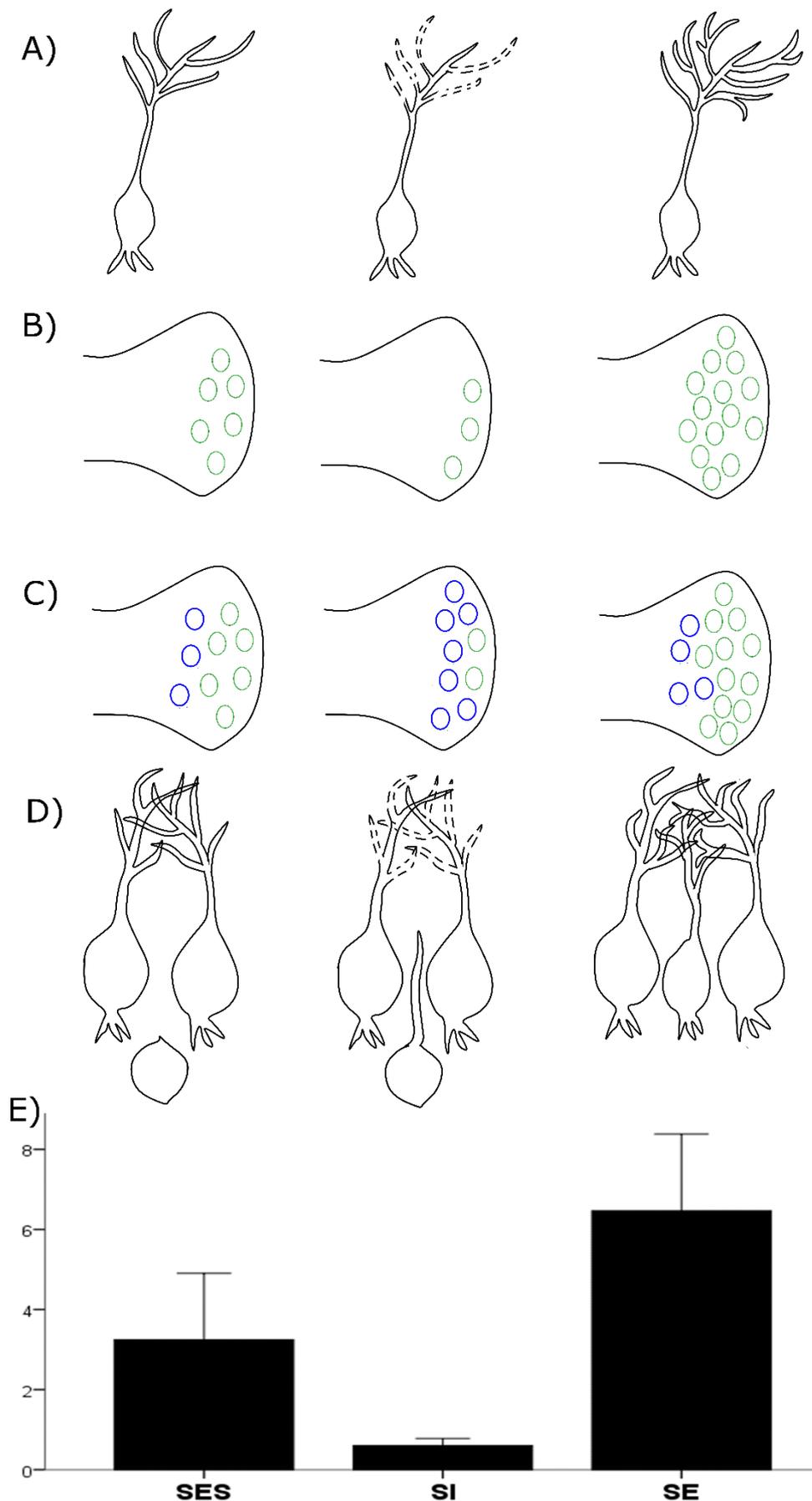


Figura 17. Posibles mecanismos de plasticidad neuronal inducidos por la experiencia sexual en el BOA. A) Poda sináptica, remodelación y formación de nuevas arborizaciones sinápticas. B) Reducción del número de vesículas sinápticas, recuperación y aumento de las vesículas sinápticas. C) Reducción del número de vesículas sinápticas con sinaptofisina (verde) incremento de otras proteínas de vesículas sinápticas (en azul) (pero no de las vesículas en general) y aumento de estas vesículas con sinaptofisina posteriormente. D) Poda sináptica para permitir la incorporación de células nuevas, las cuales se integrarían al circuito formando un mayor número de sinapsis. E) Gráfica de los resultados en la capa Gr del BOA, para reflejar como cada una de las hipótesis podría explicar nuestros resultados. Cada columna de las hipótesis anteriores coincidiría con el grupo expresado abajo en la gráfica.

Aunque la mayoría de las células se incorporan a la capa granular, cabe recordar que la sinaptofisina se encuentra en vesículas la membrana presináptica, y que las prolongaciones de estas neuronas nuevas pueden alcanzar y formar sinapsis también fuera de la capa donde se encuentra su soma (Imai 2014, Kosaka & Kosaka 2016).

En favor de una posible remodelación sináptica, también existen protocolos estandarizados que llevan a una reducción de la expresión de sinaptofisina en el BO, así como también en la neurogénesis en la edad adulta. Este es el caso de las ratas CUMS (Chronic unpredictable mild stress), las cuales son un modelo de depresión y presentan una reducción tanto en la neurogénesis como de proteínas presinápticas tras ser sometidas a varios estresores de diferente naturaleza (inclinación de la caja, nado forzado a 4°C y 45°C, privación de agua o comida, sacudidas, pellizcar la cola, aserrín mojado e inversión del ciclo de luz). Las ratas CUMS, han mostrado como agentes externos pueden alterar la plasticidad del BO y la transducción de sinaptofisina (la transcripción no se ve afectada en este caso) (Yang et al. 2011). De manera similar el enriquecimiento ambiental conlleva a una mayor expresión de sinaptofisina en hipocampo y corteza prefrontal (Frick & Fernandez 2003).

Respecto a la hipótesis, sobre una posible disminución de sinaptofisina por reducción del árbol dendrítico para permitir la inserción de neuronas nuevas, se ha relacionado un aumento de la proliferación de neuroblastos de la corriente de migración rostral y de una mayor diferenciación de estos a neuronas en el BOA (Corona et al 2016), hecho que apoyaría nuestro resultados en las hembras SI, pues sería los inicios de inserción de neuronas nuevas y en ese momento se requeriría de una reducción del árbol dendrítico

para permitir el paso, mientras que en el caso de las hembras SE se encontraría reforzando las sinapsis de neuronas ya integradas en el circuito. Actualmente se encuentran descritos los posibles mecanismos por los cuales la experiencia puede influenciar los mecanismos de integración de las neuronas nuevas (Oboti & Peretto 2014, Oboti et al 2017, Yoshihara et al 2014, Yoshihara et al 2015). También se ha descrito la formación de sinapsis de estas neuronas nuevas en la capa granular del BOP en adultos, en este proceso se presenta un patrón secuencial que genera inicialmente sinapsis en la región proximal de las dendritas apicales (más cerca del soma) y posteriormente aparecen las sinapsis más apicales (Kelsch et al 2008). Esta forma secuencial en la que aparecen las sinapsis (Kelsch et al 2008), la influencia de la experiencia olfativa en este sistema (Yoshihara et al 2014, Yoshihara et al 2015), y la proliferación de neuronas nuevas (Corona et al 2016), podría ser un mecanismo capaz de explicar nuestros datos. La experiencia sexual puede incrementar la proliferación neuronal, estas nuevas neuronas podrían generar alguna alteración del circuito ya formado para permitir su integración, lo que se traduciría en el decremento de sinaptofisina que vemos en las hembras SI, lo que posteriormente aumentaría el número de sinapsis alcanzando una mayor expresión de sinaptofisina como lo observado en las hembras SE.

Algo notable a destacar es que a pesar de las semejanzas estructurales y en su función, el BOP no presenta los cambios en la expresión de sinaptofisina. Esto apunta a que los cambios plásticos no son generales de todo el BO, sino específicos del BOA por lo que no se pueden relacionar los cambios a un enriquecimiento olfativo generado por olores del macho en el aserrín o durante la cópula.

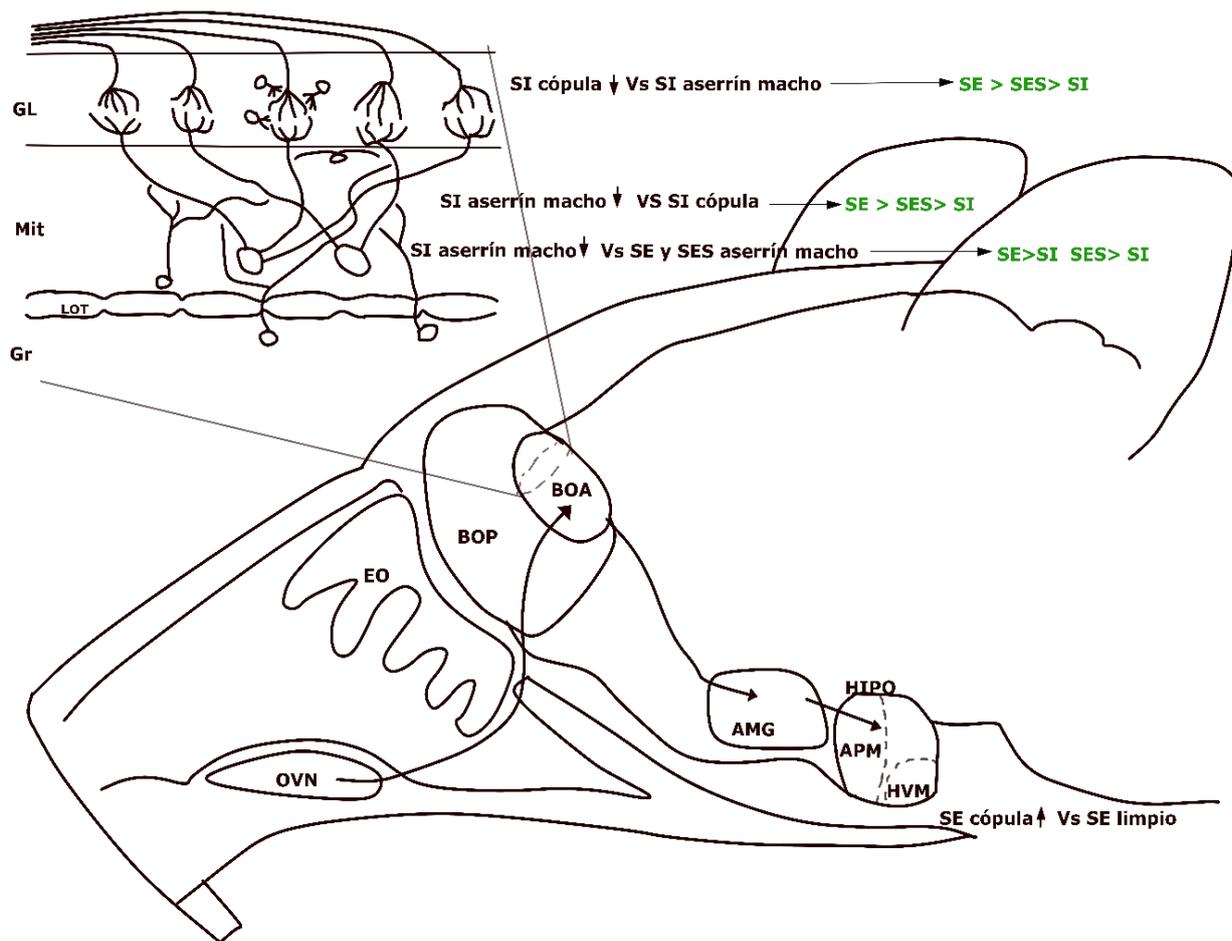


Figura 18. Esquema resumen de los principales hallazgos de este estudio referentes a la expresión de c-Fos (enunciados en negro) y sinaptofisina (enunciados en verde), en relación al circuito neuronal implicado en la conducta sexual. APM (área preóptica medial), AMG (Amígdala), BOA (Bulbo olfatorio accesorio), BOP (Bulbo olfatorio principal), EO (Epitelio olfativo), GL (capa glomerular), Gr (capa granular), HIPO (hipotálamo), HVM (hipotálamo ventromedial), Mit (capa mitral) y OVN (órgano vomeronasal).

11. Conclusión

Nuestros resultados confirman que la experiencia sexual se requiere para que el ratón hembra en respuesta a la cópula presente altos niveles de receptividad sexual. La administración de dosis altas de EB y P no son suficientes para mimetizar el incremento de receptividad producido por la experiencia sexual. Los cambios en la actividad

neuronal observados en el BOA y el HVM pueden estar asociados a la experiencia sexual. Las hembras SI mostraron que la primera reexposición a las feromonas de su compañero sexual produce una reducción de la respuesta de c-Fos en la capa mitral y glomerular del BOA. Esta reducción podría deberse a la formación de la memoria de la pareja sexual. Los datos concuerdan con la expresión de sinaptofisina, donde reportamos una reducción en la expresión de esta proteína en hembras SI y un posterior incremento en las hembras SE. Este cambio en la plasticidad neuronal en el BOA en la expresión de c-Fos no se obtiene cuando las hembras copulan repetidamente con el mismo macho. Sin embargo, estas hembras muestran un aumento de la actividad neuronal en el HVM cuando copulan. Lo cual sugiere que cuando las hembras son sexualmente expertas el BOA pierde relevancia en la conducta sexual. En lo que respecta a nuestros resultados de sinaptofisina, éstos indican que existen cambios plásticos inducidos por la experiencia sexual, y que estos modifican las sinapsis existentes en el BOA pero no en el BOP ni en el resto de las estructuras cerebrales (APM, HVM y Me) analizadas, sugiriendo que la conducta sexual produce este cambio en el BOA de forma específica.

Este cambio específico del BOA resulta muy interesante, el BO una estructura con gran potencial plástico, los estudios se han centrado mayormente en las particulares que le confieren la neurogénesis adulta mediante el aporte de nuevas células a través de la vía migratoria rostral. Los cambios plásticos detectados en este trabajo podrían ser útiles para llegar a una mayor comprensión, más integrativa, de lo que ocurre en los circuitos preexistentes del BOA y como las nuevas neuronas podían estar alterando estos, no solo con su incorporación sino que también a través de remodelaciones sinápticas.

12. Futuras direcciones

Existe muy poca literatura al respecto de los cambios plásticos inducidos por experiencia sexual en hembras de ratón, dado la complejidad que implica trabajar en una conducta dependiente del ciclo estral. Esperamos que nuestro trabajo pueda servir para iniciar estudios minuciosos alrededor de esta temática, y concientizar sobre la necesidad de la estandarización de los procesos de inducción de estro de las hembras, ya que dichos protocolos aún presentan gran variabilidad en la literatura científica. Otro aspecto interesante para estudiar es la evolución de la conducta sexual, la hembra de ratón (*Mus musculus*) es hasta el momento uno de los pocos roedores donde se ha registrado receptividad sexual inicial baja. Esto haría interesante el estudio comparativo con otras especies, en especial con el *Mus spicilegus*, el cual no muestra bajos niveles de receptividad en sus primeros encuentros sexuales además de presentar un sistema social monógamo. Así como también sería interesante nuevos estudios del BO que puedan corroborar o descartar las hipótesis que planteamos respecto a posibles mecanismos de remodelación sináptica en esta estructura. Siendo una muy buena opción estudios que combinen la neurogénesis adulta con proteínas marcadoras de sinapsis (como lo es la sinaptofisina), para poder discernir el papel que estas nuevas neuronas podrían estar jugando en la remodelación de las sinapsis preexistentes y las que se formaran de novo.

13. Referencias

- Ache BW, Young JM. 2005. Olfaction: diverse species, conserved principles. *Neuron* 48: 417-30
- Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest* 119: 1438-49
- Allen PB, Ouimet CC, Greengard P. 1997. Spinophilin, a novel protein phosphatase 1 binding protein localized to dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 9956-61
- Anderson SA, Eisenstat DD, Shi L, Rubenstein JL. 1997. Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes. *Science* 278: 474-6
- Angelo K, Margrie TW. 2011. Population diversity and function of hyperpolarization-activated current in olfactory bulb mitral cells. *Sci Rep* 1: 50
- Annas A, Bengtsson C, Tornqvist E. 2013. Group housing of male CD1 mice: reflections from toxicity studies. *Lab Anim* 47: 127-9
- Arnold MR, Thallon CL, Pitkofsky JA, Meerts SH. 2019. Sexual experience confers resilience to restraint stress in female rats. *Horm Behav* 107: 61-66
- Aroniadou-Anderjaska V, Zhou FM, Priest CA, Ennis M, Shipley MT. 2000. Tonic and synaptically evoked presynaptic inhibition of sensory input to the rat olfactory bulb via GABA(B) heteroreceptors. *J Neurophysiol* 84: 1194-203
- Arthur CP, Stowell MH. 2007. Structure of synaptophysin: a hexameric MARVEL-domain channel protein. *Structure* 15: 707-14
- Arzate DM, Portillo W, Rodriguez C, Corona R, Paredes RG. 2011. Extended paced mating tests induces conditioned place preference without affecting sexual arousal. *Horm Behav* 59: 674-80
- Au - Wallrafen R, Au - Dresbach T, Au - Viotti JS. 2019. Quantifying the Heterogeneous Distribution of a Synaptic Protein in the Mouse Brain Using Immunofluorescence. *JoVE*: e58940
- Bailey MS, Puche AC, Shipley MT. 1999. Development of the olfactory bulb: evidence for glia-neuron interactions in glomerular formation. *J Comp Neurol* 415: 423-48
- Bakker J, Honda S, Harada N, Balthazart J. 2002. The aromatase knock-out mouse provides new evidence that estradiol is required during development in the female for the expression of sociosexual behaviors in adulthood. *J Neurosci* 22: 9104-12
- Bayer SA, Altman J, Russo RJ, Zhang X. 1993. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology* 14: 83-144
- Been LE, Petrulis A. 2010. The role of the medial preoptic area in appetitive and consummatory reproductive behaviors depends on sexual experience and odor volatility in male Syrian hamsters. *Neuroscience* 170: 1120-32
- Beites CL, Kawachi S, Crocker CE, Calof AL. 2005. Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium. *Exp Cell Res* 306: 309-16
- Benito E, Barco A. 2015. The neuronal activity-driven transcriptome. *Mol Neurobiol* 51: 1071-88
- Berkowicz DA, Trombley PQ, Shepherd GM. 1994. Evidence for glutamate as the olfactory receptor cell neurotransmitter. *J Neurophysiol* 71: 2557-61
- Bharadwaj P, McInnis C, Madden AM, Bonthuis PJ, Zup S, et al. 2013. Increased dendritic spine density and tau expression are associated with individual differences in steroidal regulation of male sexual behavior. *PLoS One* 8: e69672
- Bhattacharyya S, Bronner-Fraser M. 2004. Hierarchy of regulatory events in sensory placode development. *Curr Opin Genet Dev* 14: 520-6

- Binns KE, Brennan PA. 2005. Changes in electrophysiological activity in the accessory olfactory bulb and medial amygdala associated with mate recognition in mice. *Eur J Neurosci* 21: 2529-37
- Bitran D, Shiekh M, McLeod M. 1995. Anxiolytic effect of progesterone is mediated by the neurosteroid allopregnanolone at brain GABAA receptors. *J Neuroendocrinol* 7: 171-7
- Blanchart A, De Carlos JA, Lopez-Mascaraque L. 2006. Time frame of mitral cell development in the mice olfactory bulb. *J Comp Neurol* 496: 529-43
- Blaustein J, Erskine M. 2002. Feminine Sexual Behavior: Cellular Integration of Hormonal and Afferent Information in the Rodent Forebrain. *Hormones, Brain and Behavior* 1
- Bonthuis PJ, Patteson JK, Rissman EF. 2011. Acquisition of sexual receptivity: roles of chromatin acetylation, estrogen receptor-alpha, and ovarian hormones. *Endocrinology* 152: 3172-81
- Brennan P, Kaba H, Keverne EB. 1990. Olfactory recognition: a simple memory system. *Science* 250: 1223-6
- Brennan PA, Binns EK. 2005. Vomeronasal mechanisms of mate recognition in mice. *Chem Senses* 30 Suppl 1: i148-9
- Brignall AC, Cloutier JF. 2015. Neural map formation and sensory coding in the vomeronasal system. *Cell Mol Life Sci* 72: 4697-709
- Bronner-Fraser M. 1995. Origins and developmental potential of the neural crest. *Exp Cell Res* 218: 405-17
- Bronson FH. 1979. The reproductive ecology of the house mouse. *Q Rev Biol* 54: 265-99
- Brot MD, Koob GF, Britton KT. 1995. Anxiolytic effects of steroid hormones during the estrous cycle. Interactions with ethanol. *Recent Dev Alcohol* 12: 243-59
- Bruce HM. 1959. An exteroceptive block to pregnancy in the mouse. *Nature* 184: 105
- Bulfone A, Wang F, Hevner R, Anderson S, Cutforth T, et al. 1998. An olfactory sensory map develops in the absence of normal projection neurons or GABAergic interneurons. *Neuron* 21: 1273-82
- Cadiz-Moretti B, Abellan-Alvaro M, Pardo-Bellver C, Martinez-Garcia F, Lanuza E. 2016. Afferent and Efferent Connections of the Cortex-Amygdala Transition Zone in Mice. *Front Neuroanat* 10: 125
- Calizo LH, Flanagan-Cato LM. 2003. Hormonal-neural integration in the female rat ventromedial hypothalamus: triple labeling for estrogen receptor-alpha, retrograde tract tracing from the periaqueductal gray, and mating-induced Fos expression. *Endocrinology* 144: 5430-40
- Chen TW, Lin BJ, Schild D. 2009. Odor coding by modules of coherent mitral/tufted cells in the vertebrate olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 2401-6
- Christie JM, Bark C, Hormuzdi SG, Helbig I, Monyer H, Westbrook GL. 2005. Connexin36 mediates spike synchrony in olfactory bulb glomeruli. *Neuron* 46: 761-72
- Corona R, Retana-Marquez S, Portillo W, Paredes RG. 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
- Couly GF, Le Douarin NM. 1985. Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. I. Developmental relationships between placodes, facial ectoderm, and prosencephalon. *Dev Biol* 110: 422-39
- Couper Leo JM, Brunjes PC. 2003. Neonatal focal denervation of the rat olfactory bulb alters cell structure and survival: a Golgi, Nissl and confocal study. *Developmental Brain Research* 140: 277-86
- Curran T, Morgan JI. 1987. Memories of fos. *Bioessays* 7: 255-8

- Cuschieri A, Bannister LH. 1975a. The development of the olfactory mucosa in the mouse: electron microscopy. *J Anat* 119: 471-98
- Cuschieri A, Bannister LH. 1975b. The development of the olfactory mucosa in the mouse: light microscopy. *J Anat* 119: 277-86
- Del Punta K, Puche A, Adams NC, Rodriguez I, Mombaerts P. 2002. A divergent pattern of sensory axonal projections is rendered convergent by second-order neurons in the accessory olfactory bulb. *Neuron* 35: 1057-66
- Denizet M, Cotter L, Lledo PM, Lazarini F. 2017. Sensory deprivation increases phagocytosis of adult-born neurons by activated microglia in the olfactory bulb. *Brain Behav Immun* 60: 38-43
- Desjardins C, Maruniak JA, Bronson FH. 1973. Social rank in house mice: differentiation revealed by ultraviolet visualization of urinary marking patterns. *Science* 182: 939-41
- Dewsbury DA. 1969. Copulatory behaviour of rats (*Rattus norvegicus*) as a function of prior copulatory experience. *Anim Behav* 17: 217-23
- Dudley CA, Moss RL. 1994. Lesions of the accessory olfactory bulb decrease lordotic responsiveness and reduce mating-induced c-fos expression in the accessory olfactory system. *Brain Res* 642: 29-37
- Dulac C, Torello AT. 2003. Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. *Nat Rev Neurosci* 4: 551-62
- Emery DE, Sachs BD. 1976. Copulatory behavior in male rats with lesions in the bed nucleus of the stria terminalis. *Physiol Behav* 17: 803-6
- Eshkind LG, Leube RE. 1995. Mice lacking synaptophysin reproduce and form typical synaptic vesicles. *Cell Tissue Res* 282: 423-33
- Evans GJ, Cousin MA. 2005. Tyrosine phosphorylation of synaptophysin in synaptic vesicle recycling. *Biochem Soc Trans* 33: 1350-3
- Fan S, Luo M. 2009. The organization of feedback projections in a pathway important for processing pheromonal signals. *Neuroscience* 161: 489-500
- Feinstein P, Mombaerts P. 2004. A contextual model for axonal sorting into glomeruli in the mouse olfactory system. *Cell* 117: 817-31
- Feng J, Yan Z, Ferreira A, Tomizawa K, Liauw JA, et al. 2000. Spinophilin regulates the formation and function of dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 9287-92
- Flavell SW, Greenberg ME. 2008. Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 31: 563-90
- Forni PE, Wray S. 2012. Neural crest and olfactory system: new prospective. *Mol Neurobiol* 46: 349-60
- Fortes-Marco L, Lanuza E, Martinez-Garcia F. 2013. Of pheromones and kairomones: what receptors mediate innate emotional responses? *Anat Rec (Hoboken)* 296: 1346-63
- Frick KM, Fernandez SM. 2003. Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice. *Neurobiol Aging* 24: 615-26
- Fukunaga I, Berning M, Kollo M, Schmaltz A, Schaefer AT. 2012. Two distinct channels of olfactory bulb output. *Neuron* 75: 320-9
- Gao Y, Budlong C, Durlacher E, Davison IG. 2017. Neural mechanisms of social learning in the female mouse. *Elife* 6
- Gire DH, Franks KM, Zak JD, Tanaka KF, Whitesell JD, et al. 2012. Mitral cells in the olfactory bulb are mainly excited through a multistep signaling path. *J Neurosci* 32: 2964-75
- González-Flores O, Hoffman KL, Delgadillo JA, Keller M, Paredes RG. 2017. 1.02 - Female Sexual Behavior in Rodents, Lagomorphs, and Goats In *Hormones, Brain and Behavior (Third Edition)*, ed. DW Pfaff, M Joëls, pp. 59-82. Oxford: Academic Press
- Gould VE, Lee I, Wiedenmann B, Moll R, Chejfec G, Franke WW. 1986. Synaptophysin: a novel marker for neurons, certain neuroendocrine cells, and their neoplasms. *Hum Pathol* 17: 979-83

Goyens J, Noiro E. 1975. Effects of cohabitation with females on aggressive behavior between male mice. *Dev Psychobiol* 8: 79-84

Greengard P, Valtorta F, Czernik AJ, Benfenati F. 1993. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* 259: 780-5

Guo T, Noble W, Hanger DP. 2017. Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathol* 133: 665-704

Gutierrez-Castellanos N, Pardo-Bellver C, Martinez-Garcia F, Lanuza E. 2014. The vomeronasal cortex - afferent and efferent projections of the posteromedial cortical nucleus of the amygdala in mice. *Eur J Neurosci* 39: 141-58

Halem HA, Baum MJ, Cherry JA. 2001a. Sex difference and steroid modulation of pheromone-induced immediate early genes in the two zones of the mouse accessory olfactory system. *J Neurosci* 21: 2474-80

Halem HA, Cherry JA, Baum MJ. 1999. Vomeronasal neuroepithelium and forebrain Fos responses to male pheromones in male and female mice. *J Neurobiol* 39: 249-63

Halem HA, Cherry JA, Baum MJ. 2001b. Central forebrain Fos responses to familiar male odours are attenuated in recently mated female mice. *Eur J Neurosci* 13: 389-99

Halpern M, Martinez-Marcos A. 2003. Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Prog Neurobiol* 70: 245-318

Hardy D, Saghateluyan A. 2017. Different forms of structural plasticity in the adult olfactory bulb. *Neurogenesis (Austin)* 4: e1301850

Hayar A, Shipley MT, Ennis M. 2005. Olfactory bulb external tufted cells are synchronized by multiple intraglomerular mechanisms. *J Neurosci* 25: 8197-208

Hsia AY, Vincent JD, Lledo PM. 1999. Dopamine depresses synaptic inputs into the olfactory bulb. *J Neurophysiol* 82: 1082-5

Huilgol D, Tole S. 2016. Cell migration in the developing rodent olfactory system. *Cell Mol Life Sci* 73: 2467-90

Hurst JL, Beynon RJ. 2004. Scent wars: the chemobiology of competitive signalling in mice. *Bioessays* 26: 1288-98

Igarashi KM, Ieki N, An M, Yamaguchi Y, Nagayama S, et al. 2012. Parallel mitral and tufted cell pathways route distinct odor information to different targets in the olfactory cortex. *J Neurosci* 32: 7970-85

Ikeda K, Ookawara S, Sato S, Ando Z, Kageyama R, Kawakami K. 2007. Six1 is essential for early neurogenesis in the development of olfactory epithelium. *Dev Biol* 311: 53-68

Imai T. 2014. Construction of functional neuronal circuitry in the olfactory bulb. *Semin Cell Dev Biol* 35: 180-8

Imamura F, Ayoub AE, Rakic P, Greer CA. 2011. Timing of neurogenesis is a determinant of olfactory circuitry. *Nat Neurosci* 14: 331-7

Jahn R, Schiebler W, Ouimet C, Greengard P. 1985. A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 4137-41

Janz R, Sudhof TC, Hammer RE, Unni V, Siegelbaum SA, Bolshakov VY. 1999. Essential roles in synaptic plasticity for synaptogyrin I and synaptophysin I. *Neuron* 24: 687-700

Jemiolo B, Xie TM, Novotny M. 1991. Socio-sexual olfactory preference in female mice: attractiveness of synthetic chemosignals. *Physiol Behav* 50: 1119-22

Kaczmarek L, Chaudhuri A. 1997. Sensory regulation of immediate-early gene expression in mammalian visual cortex: implications for functional mapping and neural plasticity. *Brain Res Brain Res Rev* 23: 237-56

Kang N, McCarthy EA, Cherry JA, Baum MJ. 2011. A sex comparison of the anatomy and function of the main olfactory bulb-medial amygdala projection in mice. *Neuroscience* 172: 196-204

Karlson P, Luscher M. 1959. Pheromones': a new term for a class of biologically active substances. *Nature* 183: 55-6

Kashiwayanagi M. 2014. Molecular and Neural Mechanisms of Pheromone Reception in the Rat Vomeronasal System and Changes in the Pheromonal Reception by the Maturation and Sexual Experiences In *Neurobiology of Chemical Communication*, ed. C Mucignat-Caretta. Boca Raton (FL)

Kasowski HJ, Kim H, Greer CA. 1999. Compartmental organization of the olfactory bulb glomerulus. *J Comp Neurol* 407: 261-74

Ke MT, Fujimoto S, Imai T. 2013. SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat Neurosci* 16: 1154-61

Keller M, Douhard Q, Baum MJ, Bakker J. 2006a. Destruction of the main olfactory epithelium reduces female sexual behavior and olfactory investigation in female mice. *Chem Senses* 31: 315-23

Keller M, Pierman S, Douhard Q, Baum MJ, Bakker J. 2006b. The vomeronasal organ is required for the expression of lordosis behaviour, but not sex discrimination in female mice. *Eur J Neurosci* 23: 521-30

Kelsch W, Lin CW, Lois C. 2008. Sequential development of synapses in dendritic domains during adult neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 16803-8

Kobayakawa K, Kobayakawa R, Matsumoto H, Oka Y, Imai T, et al. 2007. Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb. *Nature* 450: 503-8

Kollack-Walker S, Newman SW. 1997. Mating-induced expression of c-fos in the male Syrian hamster brain: role of experience, pheromones, and ejaculations. *J Neurobiol* 32: 481-501

Kosaka T, Kosaka K. 2016. Neuronal organization of the main olfactory bulb revisited. *Anat Sci Int* 91: 115-27

Kow LM, Montgomery MO, Pfaff DW. 1979. Triggering of lordosis reflex in female rats with somatosensory stimulation: quantitative determination of stimulus parameters. *J Neurophysiol* 42: 195-202

Kozyrev N, Coolen LM. 2015. Activation of mu or delta opioid receptors in the lumbosacral spinal cord is essential for ejaculatory reflexes in male rats. *PLoS One* 10: e0121130

Kozyrev N, Coolen LM. 2017. Activation of galanin and cholecystokinin receptors in the lumbosacral spinal cord is required for ejaculation in male rats. *Eur J Neurosci* 45: 846-58

Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. 2009. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* 32: 149-84

Lanuza E, Martín-Sánchez A, Marco-Manclús P, Cádiz-Moretti B, Fortes-Marco L, et al. 2014. Sex pheromones are not always attractive: changes induced by learning and illness in mice. *Animal Behaviour* 97: 265-72

Le Douarin N, Kalcheim C. 1999. *The Neural Crest*. Cambridge: Cambridge University Press.

Lin DM, Wang F, Lowe G, Gold GH, Axel R, et al. 2000. Formation of precise connections in the olfactory bulb occurs in the absence of odorant-evoked neuronal activity. *Neuron* 26: 69-80

Lledo PM, Valley M. 2016. Adult Olfactory Bulb Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8

Long JE, Garel S, Depew MJ, Tobet S, Rubenstein JL. 2003. DLX5 regulates development of peripheral and central components of the olfactory system. *J Neurosci* 23: 568-78

Lonstein JS, Simmons DA, Stern JM. 1998. Functions of the caudal periaqueductal gray in lactating rats: kyphosis, lordosis, maternal aggression, and fearfulness. *Behav Neurosci* 112: 1502-18

Lopez-Mascaraque L, de Castro F. 2002. The olfactory bulb as an independent developmental domain. *Cell Death Differ* 9: 1279-86

Lund TD, Rovis T, Chung WC, Handa RJ. 2005. Novel actions of estrogen receptor-beta on anxiety-related behaviors. *Endocrinology* 146: 797-807

Luo AH, Cannon EH, Wekesa KS, Lyman RF, Vandenberg JG, Anholt RR. 2002. Impaired olfactory behavior in mice deficient in the alpha subunit of G(o). *Brain Res* 941: 62-71

Maher BJ, McGinley MJ, Westbrook GL. 2009. Experience-dependent maturation of the glomerular microcircuit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 16865-70

Maier EC, Saxena A, Alsina B, Bronner ME, Whitfield TT. 2014. Sensational placodes: neurogenesis in the otic and olfactory systems. *Dev Biol* 389: 50-67

Mani SK, Fienberg AA, O'Callaghan JP, Snyder GL, Allen PB, et al. 2000. Requirement for DARPP-32 in progesterone-facilitated sexual receptivity in female rats and mice. *Science* 287: 1053-6

Marcondes FK, Miguel KJ, Melo LL, Spadari-Bratfisch RC. 2001. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiol Behav* 74: 435-40

Martin-Sanchez A, McLean L, Beynon RJ, Hurst JL, Ayala G, et al. 2015. From sexual attraction to maternal aggression: when pheromones change their behavioural significance. *Horm Behav* 68: 65-76

Martinez-Garcia F, Martinez-Ricos J, Agustin-Pavon C, Martinez-Hernandez J, Novejarque A, Lanuza E. 2009. Refining the dual olfactory hypothesis: pheromone reward and odour experience. *Behav Brain Res* 200: 277-86

Maruniak JA, Desjardins C, Bronson FH. 1975. Adaptations for urinary marking in rodents: prepuce length and morphology. *J Reprod Fertil* 44: 567-70

Matsutani S, Yamamoto N. 2000. Differentiation of mitral cell dendrites in the developing main olfactory bulbs of normal and naris-occluded rats. *J Comp Neurol* 418: 402-10

McCarthy EA, Naik AS, Coyne AF, Cherry JA, Baum MJ. 2018. Effect of Ovarian Hormones and Mating Experience on the Preference of Female Mice to Investigate Male Urinary Pheromones. *Chem Senses* 43: 97-104

Meerts SH, Park JH, Sekhawat R. 2016. Sexual experience modulates partner preference and mPOA nitric oxide synthase in female rats. *Behav Neurosci* 130: 490-9

Meisami E, Bhatnagar KP. 1998. Structure and diversity in mammalian accessory olfactory bulb. *Microsc Res Tech* 43: 476-99

Meredith M, O'Connell RJ. 1979. Efferent control of stimulus access to the hamster vomeronasal organ. *J Physiol* 286: 301-16

Meurisse M, Chaillou E, Levy F. 2009. Afferent and efferent connections of the cortical and medial nuclei of the amygdala in sheep. *J Chem Neuroanat* 37: 87-97

Meyerson BJ. 1964. Estrus behaviour in spayed rats after estrogen or progesterone treatment in combination with reserpine or tetrabenazine. *Psychopharmacologia* 6: 210-8

Mohedano-Moriano A, Pro-Sistiaga P, Ubeda-Banon I, Crespo C, Insausti R, Martinez-Marcos A. 2007. Segregated pathways to the vomeronasal amygdala: differential projections from the anterior and posterior divisions of the accessory olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 25: 2065-80

Mombaerts P, Wang F, Dulac C, Chao SK, Nemes A, et al. 1996. Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87: 675-86

Moncho-Bogani J, Lanuza E, Hernandez A, Novejarque A, Martinez-Garcia F. 2002. Attractive properties of sexual pheromones in mice: innate or learned? *Physiol Behav* 77: 167-76

Moncho-Bogani J, Lanuza E, Lorente MJ, Martinez-Garcia F. 2004. Attraction to male pheromones and sexual behaviour show different regulatory mechanisms in female mice. *Physiol Behav* 81: 427-34

Moncho-Bogani J, Martinez-Garcia F, Novejarque A, Lanuza E. 2005. Attraction to sexual pheromones and associated odorants in female mice involves activation of the reward system and basolateral amygdala. *Eur J Neurosci* 21: 2186-98

Murdoch B, Roskams AJ. 2007. Olfactory epithelium progenitors: insights from transgenic mice and in vitro biology. *J Mol Histol* 38: 581-99

- Murphy GJ, Darcy DP, Isaacson JS. 2005. Intraglomerular inhibition: signaling mechanisms of an olfactory microcircuit. *Nat Neurosci* 8: 354-64
- Nagayama S, Takahashi YK, Yoshihara Y, Mori K. 2004. Mitral and Tufted Cells Differ in the Decoding Manner of Odor Maps in the Rat Olfactory Bulb. *Journal of Neurophysiology* 91: 2532-40
- Nanda P, Inbar T, Bergan JF. 2017. Exciting experiences make neurons less excitable. *Elife* 6
- Nieto-Sampedro M, Doncel-Pérez E, Nieto-Díaz M. 2006. *La Olfacción en España*.
- Nobrega-Pereira S, Marin O. 2009. Transcriptional control of neuronal migration in the developing mouse brain. *Cereb Cortex* 19 Suppl 1: i107-13
- Norlin EM, Vedin V, Bohm S, Berghard A. 2005. Odorant-dependent, spatially restricted induction of c-fos in the olfactory epithelium of the mouse. *J Neurochem* 93: 1594-602
- Novotny M, Jorgenson JW, Carmack M, Wilson SR, Boyse EA, et al. 1980. Chemical Studies of the Primer Mouse Pheromones In *Chemical Signals: Vertebrates and Aquatic Invertebrates*, ed. D Müller-Schwarze, RM Silverstein, pp. 377-90. Boston, MA: Springer US
- Nyuyki KD, Waldherr M, Baeuml S, Neumann ID. 2011. Yes, I am ready now: differential effects of paced versus unpaced mating on anxiety and central oxytocin release in female rats. *PLoS One* 6: e23599
- Oboti L, Peretto P. 2014. How neurogenesis finds its place in a hardwired sensory system. *Front Neurosci* 8: 102
- Oboti L, Savalli G, Giachino C, De Marchis S, Panzica GC, et al. 2009. Integration and sensory experience-dependent survival of newly-generated neurons in the accessory olfactory bulb of female mice. *Eur J Neurosci* 29: 679-92
- Oboti L, Schellino R, Giachino C, Chamero P, Pyrski M, et al. 2011. Newborn interneurons in the accessory olfactory bulb promote mate recognition in female mice. *Front Neurosci* 5: 113
- Oboti L, Trova S, Schellino R, Marraudino M, Harris NR, et al. 2017. Activity Dependent Modulation of Granule Cell Survival in the Accessory Olfactory Bulb at Puberty. *Front Neuroanat* 11: 44
- Osumi-Yamashita N, Ninomiya Y, Doi H, Eto K. 1994. The contribution of both forebrain and midbrain crest cells to the mesenchyme in the frontonasal mass of mouse embryos. *Dev Biol* 164: 409-19
- Osumi-Yamashita N, Ninomiya Y, Eto K. 1997. Mammalian craniofacial embryology in vitro. *Int J Dev Biol* 41: 187-94
- Oyola MG, Portillo W, Reyna A, Foradori CD, Kudwa A, et al. 2012. Anxiolytic effects and neuroanatomical targets of estrogen receptor-beta (ERbeta) activation by a selective ERbeta agonist in female mice. *Endocrinology* 153: 837-46
- Pankevich DE, Baum MJ, Cherry JA. 2004. Olfactory sex discrimination persists, whereas the preference for urinary odorants from estrous females disappears in male mice after vomeronasal organ removal. *J Neurosci* 24: 9451-7
- Paxinos G, Franklin KBJ. 2004. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Elsevier Academic Press.
- Peretto P, Giachino C, Panzica GC, Fasolo A. 2001. Sexually dimorphic neurogenesis is topographically matched with the anterior accessory olfactory bulb of the adult rat. *Cell Tissue Res* 306: 385-9
- Pfaff D, Montgomery M, Lewis C. 1977. Somatosensory determinants of lordosis in female rats: behavioral definition of the estrogen effect. *J Comp Physiol Psychol* 91: 134-45
- Pfaff DW, Lewis C. 1974. Film analyses of lordosis in female rats. *Horm Behav* 5: 317-35
- Pfaff DW, Sakuma Y. 1979a. Deficit in the lordosis reflex of female rats caused by lesions in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Physiol* 288: 203-10

Pfaff DW, Sakuma Y. 1979b. Facilitation of the lordosis reflex of female rats from the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Physiol* 288: 189-202

Pfeiffer CA, Johnston RE. 1994. Hormonal and behavioral responses of male hamsters to females and female odors: roles of olfaction, the vomeronasal system, and sexual experience. *Physiol Behav* 55: 129-38

Portillo W, Gonzalez-Flores O, Camacho FJ, Mani SK, Paredes RG. 2016. Participation of progesterone receptors in facilitation and sequential inhibition of lordosis response induced by ring A-reduced progesterone metabolites in female mice. *Behav Neurosci* 130: 624-34

Portillo W, Unda N, Camacho FJ, Sanchez M, Corona R, et al. 2012. Sexual activity increases the number of newborn cells in the accessory olfactory bulb of male rats. *Front Neuroanat* 6: 25

Powers JB, Winans SS. 1973. Sexual behavior in peripherally anosmic male hamsters. *Physiol Behav* 10: 361-8

Pressler RT, Strowbridge BW. 2006. Blanes cells mediate persistent feedforward inhibition onto granule cells in the olfactory bulb. *Neuron* 49: 889-904

Puche AC, Shipley MT. 2001. Radial glia development in the mouse olfactory bulb. *J Comp Neurol* 434: 1-12

Rich TJ, Hurst JL. 1998. Scent marks as reliable signals of the competitive ability of mates. *Anim Behav* 56: 727-35

Rich TJ, Hurst JL. 1999. The competing countermarks hypothesis: reliable assessment of competitive ability by potential mates. *Anim Behav* 58: 1027-37

Salais-Lopez H, Agustin-Pavon C, Lanuza E, Martinez-Garcia F. 2018. The maternal hormone in the male brain: Sexually dimorphic distribution of prolactin signalling in the mouse brain. *PLoS One* 13: e0208960

Schlosser G. 2006. Induction and specification of cranial placodes. *Dev Biol* 294: 303-51

Schmitt U, Tanimoto N, Seeliger M, Schaeffel F, Leube RE. 2009. Detection of behavioral alterations and learning deficits in mice lacking synaptophysin. *Neuroscience* 162: 234-43

Schoppa NE, Westbrook GL. 2001. Glomerulus-specific synchronization of mitral cells in the olfactory bulb. *Neuron* 31: 639-51

Shughrue PJ, Dorsa DM. 1994. The ontogeny of GAP-43 (neuromodulin) mRNA in postnatal rat brain: evidence for a sex dimorphism. *J Comp Neurol* 340: 174-84

Sokolowski K, Corbin JG. 2012. Wired for behaviors: from development to function of innate limbic system circuitry. *Front Mol Neurosci* 5: 55

Sosulski DL, Bloom ML, Cutforth T, Axel R, Datta SR. 2011. Distinct representations of olfactory information in different cortical centres. *Nature* 472: 213-6

Stenman J, Toresson H, Campbell K. 2003. Identification of two distinct progenitor populations in the lateral ganglionic eminence: implications for striatal and olfactory bulb neurogenesis. *J Neurosci* 23: 167-74

Stowers L, Liberles SD. 2016. State-dependent responses to sex pheromones in mouse. *Curr Opin Neurobiol* 38: 74-9

Su CY, Menuz K, Carlson JR. 2009. Olfactory perception: receptors, cells, and circuits. *Cell* 139: 45-59

Suzuki J, Osumi N. 2015. Neural crest and placode contributions to olfactory development. *Curr Top Dev Biol* 111: 351-74

Tachikawa KS, Yoshihara Y, Kuroda KO. 2013. Behavioral transition from attack to parenting in male mice: a crucial role of the vomeronasal system. *J Neurosci* 33: 5120-6

Takacs S, Gries R, Gries G. 2017. Sex Hormones Function as Sex Attractant Pheromones in House Mice and Brown Rats. *Chembiochem* 18: 1391-95

Taziaux M, Bakker J. 2015. Absence of Female-Typical Pheromone-Induced Hypothalamic Neural Responses and Kisspeptin Neuronal Activity in alpha-Fetoprotein Knockout Female Mice. *Endocrinology* 156: 2595-607

Thompson ML, Edwards DA. 1971. Experiential and strain determinants of the estrogen-progesterone induction of sexual receptivity in spayed female mice. *Hormones and Behavior* 2: 299-305

Treloar HB, Miller AM, Ray A, Greer CA. 2010. Development of the Olfactory System In *The Neurobiology of Olfaction*, ed. A Menini. Boca Raton (FL)

Treloar HB, Purcell AL, Greer CA. 1999. Glomerular formation in the developing rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 413: 289-304

Uphouse L, Hiegel C, Adams S, Murillo V, Martinez M. 2014. Prior hormonal treatment, but not sexual experience, reduces the negative effects of restraint on female sexual behavior. *Behav Brain Res* 259: 35-40

Uphouse L, Hiegel C, Martinez G, Solano C, Gusick W. 2015. Repeated estradiol benzoate treatment protects against the lordosis-inhibitory effects of restraint and prevents effects of the antiprogestin, RU486. *Pharmacol Biochem Behav* 137: 1-6

Valtorta F, Pennuto M, Bonanomi D, Benfenati F. 2004. Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *Bioessays* 26: 445-53

Valverde F, Lopez-Mascaraque L. 1991. Neuroglial arrangements in the olfactory glomeruli of the hedgehog. *J Comp Neurol* 307: 658-74

van der Linden C, Jakob S, Gupta P, Dulac C, Santoro SW. 2018. Sex separation induces differences in the olfactory sensory receptor repertoires of male and female mice. *Nat Commun* 9: 5081

Van Loo PL, Mol JA, Koolhaas JM, Van Zutphen BF, Baumans V. 2001. Modulation of aggression in male mice: influence of group size and cage size. *Physiol Behav* 72: 675-83

Vandenbergh JG, Whitsett JM, Lombardi JR. 1975. Partial isolation of a pheromone accelerating puberty in female mice. *J Reprod Fertil* 43: 515-23

Ventura-Aquino E, Paredes RG. 2020. Sexual behavior in rodents: Where do we go from here? *Horm Behav* 118: 104678

Wachowiak M, Shipley MT. 2006. Coding and synaptic processing of sensory information in the glomerular layer of the olfactory bulb. *Semin Cell Dev Biol* 17: 411-23

Wagner S, Gresser AL, Torello AT, Dulac C. 2006. A multireceptor genetic approach uncovers an ordered integration of VNO sensory inputs in the accessory olfactory bulb. *Neuron* 50: 697-709

Walf AA, Frye CA. 2005a. Antianxiety and antidepressive behavior produced by physiological estradiol regimen may be modulated by hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *Neuropsychopharmacology* 30: 1288-301

Walf AA, Frye CA. 2005b. ERbeta-selective estrogen receptor modulators produce antianxiety behavior when administered systemically to ovariectomized rats. *Neuropsychopharmacology* 30: 1598-609

Whitfield TT. 2013. Shedding new light on the origins of olfactory neurons. *Elife* 2: e00648

Whitlock KE, Westerfield M. 2000. The olfactory placodes of the zebrafish form by convergence of cellular fields at the edge of the neural plate. *Development* 127: 3645-53

Wichterle H, Turnbull DH, Nery S, Fishell G, Alvarez-Buylla A. 2001. In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development* 128: 3759-71

Wiedenmann B, Franke WW. 1985. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell* 41: 1017-28

Wyatt TD. 2017. Pheromones. *Curr Biol* 27: R739-R43

- Xu PS, Lee D, Holy TE. 2016. Experience-Dependent Plasticity Drives Individual Differences in Pheromone-Sensing Neurons. *Neuron* 91: 878-92
- Yang JJ, Larsen CM, Grattan DR, Erskine MS. 2009. Mating-induced neuroendocrine responses during pseudopregnancy in the female mouse. *J Neuroendocrinol* 21: 30-9
- Yoshihara S, Takahashi H, Nishimura N, Kinoshita M, Asahina R, et al. 2014. Npas4 regulates Mdm2 and thus Dcx in experience-dependent dendritic spine development of newborn olfactory bulb interneurons. *Cell Rep* 8: 843-57
- Yoshihara S, Takahashi H, Tsuboi A. 2015. Molecular Mechanisms Regulating the Dendritic Development of Newborn Olfactory Bulb Interneurons in a Sensory Experience-Dependent Manner. *Front Neurosci* 9: 514