

10 03040



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

EVALUACIÓN DEL FUNCIONAMIENTO DEL
SISTEMA VOMERONASAL POR FOS EN
RATAS MACHO CON LESIONES DEL ÁREA
PREÓPTICA MEDIA DEL HIPOTÁLAMO
ANTERIOR (APM/HA).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

P R E S E N T A

BIOL. HÉCTOR ARTURO HURTAZO OLIVA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. RAÚL GERARDO PAREDES GUERRERO

INB

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mi abuelita: **Victoria †**
Incansable fuente de inspiración

A mi mamá: **Maricela**
Ejemplo de tenacidad y perseverancia

A mi tía: **Lourdes**
Por su positivismo y su disposición a enfrentar la vida

" Que quede dicho que, de una vez por todas, hay muchas cosas que no quiero saber. La sabiduría marca unos límites incluso al conocimiento ".

Friedrich Nietzsche,

AGRADECIMIENTOS

A **Ofelia** porque su ayuda a sido un gran apoyo en mi vida, el cual me ha permitido seguir adelante.

A mi hermana **Addy** por que poco a poco estamos saliendo adelante en la vida, cumpliendo nuestros sueños.

A toda la banda de la Facultad de Ciencias: Ya que los sueños aún no han muerto, sino que siguen más vivos que nunca. La utopía muy pronto formara parte de nuestras vidas, ya que ello aún esta en nuestras manos.

A toda la gente del laboratorio: Wendy, Patricia, Emilio, Lucy y Francisco por su gran amistad, ya que hemos hecho del laboratorio una extensión del hogar y de nosotros una gran familia.

Al Doctor Manuel Salas y a Carmelita por todo su apoyo y comprensión durante toda mi Maestría.

A los sinodales que gentilmente revisaron el presente manuscrito, gracias por sus consejos.

Mención especial merece el Doctor Paredes por su gran ayuda durante estos últimos tres años en los cuales he estado bajo su tutoría.

CRÉDITOS

La presente tesis fue realizada en el laboratorio de "Conducta Sexual y Plasticidad" del departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva del *Instituto de Neurobiología*. Campus UNAM-UAQ Juriquilla, Querétaro 76001 México.

Con el apoyo del "Programa de Becas Nacionales para Estudios de Posgrado (Complemento)" de la UNAM. Y con Beca Nacional del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Becario 14493.

Quiero agradecer especialmente a:

Francisco Javier Camacho Barrios por su asesoramiento técnico y ayuda en la realización de las pruebas conductuales.

Ma. de Lourdes Lara Anaya y Leopoldo González Santos por su ayuda en la obtención de imágenes y en la realización de presentación de trabajos ante congresos, tanto nacionales como internacionales.

Ma. del Pilar Galarza Barrios por su ayuda en la búsqueda y recuperación bibliográfica.

Con el apoyo de la **Universidad libre, plural y gratuita** que me ha permitido estudiar en sus aulas toda mi formación académica. Gracias a la Institución y a las personas que la forman: académicos, alumnos y trabajadores.

+INDICE

Abstract.....	vii
Resumen.....	ix
Introducción.....	1

Capítulo I Conducta Sexual y su Control Neural

1.1 Conducta Sexual en la rata macho.....	4
1.1.1 Descripción de la conducta sexual en la rata macho.....	4
1.1.2 Control hormonal de la reproducción en la rata macho.....	9
1.1.3 Aspectos motivacionales relacionados con la conducta sexual.....	11
1.2 Importancia del sistema vomeronasal y claves quimiosensoriales.....	15
1.2.1 Organización anatómica del sistema vomeronasal.....	16
1.2.2 Estudio de lesiones del sistema vomeronasal en el control de la conducta sexual.....	19
1.3 Otras estructuras cerebrales involucradas en la conducta sexual.....	22
1.4 Área preóptica media del hipotálamo anterior (APM/HA).....	23
1.4.1 Lesiones en el APM/HA.....	25
1.5 Retroalimentación entre estructuras del Sistema Vomeronasal.....	30

Capítulo II C-FOS y Conducta Sexual

2.1 El gen temprano c-fos y estudios de conducta en sistema nervioso.....	32
2.2 c-fos y conducta sexual.....	35

Capítulo III Trabajo de investigación

3.1 Planteamiento del problema.....	37
3.2 Objetivos.....	38
3.3 Hipótesis.....	38
3.4 Sujetos.....	39
3.5 Aparatos.....	39

3.5.1	Cajas de Conducta Sexual.....	39
3.5.2	Cajas de Coordinación Motora.....	40
3.6	Drogas administradas a las ratas hembra.....	41
3.7	Procedimiento Experimental.....	42
3.8	Pruebas Conductuales y Cirugía.....	42
3.8.1	Conducta Sexual.....	43
3.8.2	Cirugía.....	44
3.8.3	Pruebas de Coordinación Motora.....	44
3.8.4	Pruebas Motivacionales.....	46
3.9	Exposición de los machos a aserrín de ratas hembra en estro	46
3.10	Histología.....	47
3.11	Inmunohistoquímica.....	48
3.12	Conteo del Número de Células Inmunoreactivas a Fos.....	48
3.13	Análisis Estadístico.....	50
Capítulo IV Resultados		
4.1	Histología.....	51
4.2	Conducta Sexual.....	52
4.3	Pruebas de Coordinación Motora.....	58
4.4	Pruebas Motivacionales.....	60
4.5	Inmunohistoquímica contra Fos.....	62
Capítulo V Discusión y Conclusiones		
5.1	Discusión.....	63
5.2	Conclusiones.....	70
Referencias.....		71

ABSTRACT

Bilateral destruction of the medial preoptic area/anterior hypothalamus (MPOA/AH), inhibits sexual behavior in male rats. We have demonstrated that the integrity of neurons in this region is important for determining partner and olfactory preference in males. The vomeronasal pathway is crucial for the processing of sexually relevant chemosensory cues.

In the present experiment we asked if a MPOA lesion modifies FOS expression in this pathway in response to bedding from estrous females, as a possibility that could explain why a male rat does not mate after an MPOA lesion.

Male rats that ejaculated in three tests with receptive females received a bilateral lesion of the MPOA. One week after the lesion, subjects were tested again for sexual behavior once weekly for 3 weeks. Then the animals were tested for their motor coordination and sexual performance in the test for sexual motivation. Finally, after the behavioral test, the subjects were exposed to either clean or estrous bedding during 90 min before their brains were processed for FOS immunocytochemistry. Alternate sections were stained with cresyl violet to determine the extent of the lesion.

No differences in the number of immunoreactive cells along the vomeronasal circuit between animals with bilateral destruction of the MPOA or animals with lesions outside this brain region were observed except in the mitral layer of the accessory olfactory bulb. These results indicate that lesions in the MPOA inhibit sexual behavior without modifying the processing of sexually relevant chemosensory cues in other structures like medial amygdala, when evaluated by FOS expression.

We also studied if the MPOA lesioned produced motor effect that could inhibit sexual behavior. Motor execution was evaluated in a Rota Rod test. No effects on motor execution were observed in animals with MPOA lesions.

Others studies in bulls, sheep and pigs have demonstrated that males observing other males copulate enhance their sexual performance. In the present experiment male rats with MPOA lesions failed to copulate although repeatedly tested when a sexually active male was copulating with a receptive female.

RESUMEN

La destrucción bilateral del continuo área preóptica media/hipotálamo anterior (APM/HA), inhibe la conducta sexual masculina. En nuestro laboratorio hemos determinado que la integridad de las neuronas en esta región es importante para determinar la preferencia sexual y olfatoria en ratas macho. Así también el Sistema Vomeronasal es importante para el procesamiento de las señales olfatorias sexualmente relevantes, provenientes de una hembra receptiva.

El objetivo del presente trabajo es evaluar si las lesiones del APM/HA modifican la expresión de Fos en el Sistema Vomeronasal en respuesta a una cama de aserrín de hembras en estro como estímulo, como una posibilidad que pudiera explicar porque una rata macho experta pierde la conducta sexual después de la lesión del APM/HA.

Ratas macho que eyacularon en tres pruebas de conducta sexual con una hembra receptiva, recibieron una lesión electrolítica bilateral del APM/HA. Una semana después de la lesión los sujetos fueron evaluados en tres pruebas de conducta sexual con una semana de diferencia cada una. Después los animales fueron evaluados en su coordinación motora. En seguida se sometieron a 3 pruebas de estimulación sexual. Por último después de las pruebas conductuales, los sujetos fueron expuestos a una cama de aserrín de hembras en estro ó a una cama de aserrín limpio durante 90 minutos, posteriormente los cerebros fueron cortados y procesados para la inmunohistoquímica para Fos. Secciones alternadas fueron teñidas con violeta de cresilo para determinar la extensión de la lesión.

No se encontraron diferencias significativas en el número de células inmunoreactivas a Fos en el Sistema Vomeronasal, entre animales con lesión bilateral del APM/HA ó animales con lesiones falsa de esta estructura, excepto en la capa mitral del bulbo olfatorio accesorio. Estos resultados indican que

lesiones del APM/HA inhiben la conducta sexual sin modificar el procesamiento de las señales olfatorias sexualmente relevante en estructuras como la amígdala medial evaluado por Fos.

También estudiamos si la lesión del APM/HA provoca daños motores que pudieran a su vez explicar la inhibición de la conducta sexual. La ejecución motora fue evaluada en un rodillo rodante (Rota Rod) y no se observaron diferencias en la ejecución motora de los animales lesionados comparándolos con los animales control.

Estudios en toros, ovejas, cerdos y ratas han demostrado que animales que observan a otros machos copular, aumentan su ejecución sexual. Las ratas lesionadas sometida una prueba motivacional no recuperaron la conducta, lo que prueba que el efecto de las lesiones no puede ser revertido por tratamientos conductuales.

Los efectos más dramáticos sobre la conducta sexual masculina, se han encontrado al lesionar bilateralmente el continuo área preóptica media/hipotálamo anterior (APM/HA), que forma parte del llamado Sistema Olfatorio Accesorio ó Sistema Vomeronasal (SV).

El objetivo del presente trabajo es determinar la influencia de la lesión del APM/HA en la actividad neuronal del resto del SV (bulbo olfatorio accesorio (BOA) y amígdala medial), por medio de la proteína *Fos* y si estas lesiones, afectan la coordinación motora de las ratas. Por último determinar si la ejecución sexual se recupera con pruebas motivacionales en aquellos animales que la perdieron debido a la lesión.

Se utilizaron ratas macho que recibieron una lesión electrolítica del APM/HA (55 mA por 30 seg.). Al final de las pruebas conductuales los sujetos fueron sacrificados y los cortes cerebrales procesados para la inmunohistoquímica contra la proteína *Fos*.

Los resultados muestran que la lesión bilateral del APM que afecta la preferencia olfatoria del macho por una hembra receptiva, altera el procesamiento por el SV, de las señales olfatorias sexualmente relevantes a nivel de la capa mitral del BOA. Asimismo las lesiones no afectan la coordinación motora de los animales, lo que demuestra que la falta de copulación en los animales no se debe a una en la coordinación motora de la rata. Por último, las ratas lesionadas sometidas una prueba motivacional no recuperaron la conducta, lo que concuerda con trabajos previos en los que el efecto de las lesiones no pueden ser revertido por ningún tipo de tratamiento.

INTRODUCCIÓN

La reproducción es un proceso característico de cada especie animal, la cual, a través del intercambio de material genético incrementa la variabilidad genética y permite la generación de nuevos individuos (Alcock, 1979). Requiere de la interacción compleja de diversos sistemas fisiológicos y su realización implica la ejecución de un repertorio conductual característico de cada especie: el comportamiento sexual. La ocurrencia y la secuencia bien definida de estas respuestas conductuales aseguran el éxito de la interacción sexual, la cual depende de la coordinación funcional de sistemas neurales, endócrinos y viscerales. Puede también ser modificada por factores ambientales, sociales, de edad y de experiencia, entre otros (Larsson, 1979). La conducta copulatoria depende de hormonas producidas por las gónadas, que a su vez están controladas por la hipófisis. La conducta se presenta por primera vez y en forma completa cuando las gónadas empiezan a funcionar, lo que permite inferir que estas glándulas son las que determinan la conducta sexual (Larsson, 1979). El lóbulo anterior de la hipófisis participa en el control tanto de la producción de gametos como de las hormonas esteroideas (secretadas por las gónadas) y estas hormonas hipofisiarias se encuentran bajo el control del hipotálamo a través de la secreción de factores liberadores e inhibidores.

Al igual que en otras conductas dirigidas a una meta o motivadas, en la conducta sexual hay una distinción entre la búsqueda del contacto sexual (motivación sexual o libido) y la capacidad para realizar la actividad copulatoria (ejecución o potencia).

La expresión de la conducta sexual se manifiesta de diferente manera dependiendo de la especie. En el caso de la rata macho la conducta sexual se ha dividido en diferentes fases: precopulatoria, copulatoria y postcopulatoria. La fase precopulatoria consiste básicamente de olfateo, exploración genital, aseo y persecución de la compañera (Hlinak, 1986; Hlinak y cols., 1987). Para la aparición de la conducta copulatoria es determinante el despliegue de conductas por parte de la hembra: brincoteo, desplazamiento en zigzag y movimiento de orejas (Hlinak, 1990). En la fase copulatoria, la rata macho exhibe una

serie de movimientos estereotipados fácilmente distinguibles en montas, intromisiones y eyaculaciones (Hard y Larsson, 1968; Larsson, 1979) (Fig. 1). Los parámetros comúnmente utilizados en la cuantificación de la conducta sexual de la rata macho son: latencia de monta, latencia de intromisión, latencia de eyaculación, intervalo posteyaculatorio y número de montas e intromisiones preeyaculatorias. La fase postcopulatoria se caracteriza por el acicalamiento y el reposo por parte del macho.

Algunos estudios se han enfocado a tratar de encontrar el posible substrato neural de la conducta sexual. Así se han estimulado y lesionado diferentes áreas cerebrales como son el hipotálamo (Larsson, 1979), el bulbo olfatorio (Heimer y Larsson, 1967), la amígdala (Schwartz y Kling, 1964; Harris y Sachs, 1975), la estría terminal (Schwartz y Kling, 1964; Harris y Sachs, 1975) y el hipocampo (Deswurry y cols., 1968).

El área preóptica media (APM) y el campo tegmental central (CTC) en particular se han relacionado de manera importante con el control de la conducta sexual, ya que los efectos más dramáticos descritos sobre la conducta sexual se observan al lesionar dichas estructuras (Brookhart D, 1941; Hansen S y col., 1982; Hillarp y col., 1954; Brackett NL. & Edwards DA, 1984; Edwards DA & Einhorn LC, 1986; Maillard CA & Edwards DA, 1991)

La estimulación eléctrica del APM facilita la conducta sexual en diversas especies de animales. Esta facilitación involucra una reducción en el número de intromisiones necesarias para eyacular (Malsbury, 1971; Merari y Ginton, 1975; Van Dis y Larsson, 1971) y una importante reducción en el intervalo posteyaculatorio (Madlafousek y cols. 1970; Malsbury, 1971; Merari y Ginton, 1975; Van Dis y Larsson, 1971). Por el contrario, lesiones electrolíticas bilaterales del APM alteran la conducta sexual en la rata macho (ya sea deteriorándola o eliminándola por completo, dependiendo del tamaño de la lesión), mientras que lesiones unilaterales en la misma región carecen de efecto (Lisk, 1968). Los efectos de esta lesión bilateral sobre la conducta sexual no están asociados a alteraciones hormonales, de erección o eyaculación.

Por las evidencias antes descritas, la mayoría de los expertos concuerdan en que el APM (Fig. 3), es quizás la estructura más importante del cerebro involucrada en el control de la conducta sexual masculina (Hart y Ladewig, 1979). Así mismo, un número importante de autores coincide en que el control que tiene el APM sobre la conducta sexual se logra por medio de axones que corren a través del haz medial del telencéfalo (HMT) (Brackett y Edwards, 1984). Las células del APM mandan fibras eferentes a través del HMT que pasan a través y/o terminan en el tegmento ventral y dorsolateral del mesencéfalo (Conrad y Pfaff, 1976).

A través de numerosos estudios se ha demostrado que el órgano vomeronasal (OVN) regula la acción feromonal involucrada en el mantenimiento de la conducta sexual tanto masculina como femenina (Commins y Yahr, 1984; Emery y Sachs, 1976). Así mismo, está involucrado en mecanismos feromonales primarios que afectan la gestación (Halpern, 1987; Bellringer y cols., 1980), el ciclo estral (Ingersoll, 1981) y la conducta materna (Fleming y cols., 1979). Segovia y Guillamón en 1993 describieron que este sistema es indispensable para la reproducción sexual en mamíferos. La conducta reproductora y/o los cambios neuroendócrinos de ambos sexos se ven facilitados por claves feromonales que son detectadas por receptores del órgano vomeronasal (OVN), que a su vez transmite esta información hacia el bulbo olfatorio accesorio, la amígdala, el núcleo de la cama de la estría terminal y el APM (De Olmos y col., 1978; Scalia y Winans, 1975; Shipley y Adamek, 1994; Shiosaka y col., 1983). (Ver Fig. 2).

Por otro lado se han utilizado métodos inmunohistoquímicos para visualizar la proteína Fos, que es el producto nuclear del proto-oncogen *c-fos*, como un medio para identificar las neuronas que se activan en respuesta a varios estímulos sensoriales, incluyendo aquellos asociados con la cópula (Baum y Everitt, 1992).

En la presente tesis se pretende encontrar si una lesión del APM cambia la expresión de la proteína Fos inducida por estímulos olfatorios sexualmente relevantes en estructuras vomeronasales como el bulbo olfatorio accesorio y la amígdala medial.

CAPITULO I

CONDUCTA SEXUAL Y SU CONTROL NEURAL

1.1 Conducta Sexual en la rata macho

1.1.1 Descripción de la conducta sexual en la rata macho.

Todas las especies manifiestan diferentes tipos de expresiones conductuales, entre las cuales la conducta sexual resulta de especial relevancia ya que ésta garantiza la supervivencia de las especies tanto en el espacio como en el tiempo. La expresión de cualquier conducta requiere cambios en el organismo a nivel neuroendócrino, fisiológico y anatómico. La expresión de la conducta sexual se da por la acción del sistema nervioso central (SNC) y se manifiesta de diferente manera dependiendo de la especie. En la Fig. 1 se muestran los principales componentes de la conducta sexual en la rata macho.

La conducta sexual de la rata se divide en conducta precopulatoria o motivacional, y en conducta copulatoria. La primera lleva al sujeto a la búsqueda y al inicio de la interacción con la pareja sexual, el segundo es un componente consumatorio o de ejecución el cual le permite llevar a cabo dicha interacción. Sobre estos dos componentes actúa un mecanismo modulador que puede inhibir la expresión de la conducta sexual en condiciones inapropiadas como aquellas que puedan poner en peligro a la pareja, como es la presencia de depredadores. Por último también existe un componente postcopulatorio. Generalmente los estudios de la conducta sexual se enfocan básicamente a las expresiones conductuales de la fase copulatoria (montas, intromisiones y eyaculaciones). Sin embargo, la fase precopulatoria determina en muchos casos la aparición o no-aparición de la conducta copulatoria.



Fig.1 Conducta sexual de la rata macho. Adaptado de Slob y Van der Werff, 1997).

Conducta precopulatoria

Esta conducta puede llegar a durar desde unos cuantos segundos hasta horas dependiendo de la especie y de la experiencia sexual previa (Sachs y Meisel, 1988). En las ratas, esta conducta consiste básicamente de olfateo de la región perineal, exploración genital, aseo y persecución del compañero (Hlinak, 1986; Hlinak y cols., 1987). Para la aparición de la conducta copulatoria es determinante el despliegue de conductas de atracción por parte de la hembra: brincoteo (*hopping*), desplazamiento en zig-zag (*darting*) y movimiento de orejas (*ear wiggling*) (Hlinak, 1990). Durante este periodo los roedores machos y hembras pueden emitir vocalizaciones ultrasónicas (Floody y Pfaff, 1977; Floody y col., 1977;

Geyer y col., 1978; McIntosh y Barfield, 1980; Nyby, 1983; Pomerantz y Clements, 1981; Whitney y col., 1973). Dichos sonidos tienden a aumentar la excitación de la pareja y la excitación del animal emisor. Más aún, si la estimulación producida por el compañero no es la adecuada en la conducta precopulatoria, la cópula puede no ocurrir (Sachs y Meisel, 1988). Se ha demostrado que una hembra que no muestra la conducta precopulatoria aún estando sexualmente receptiva (es decir la rata hembra puede presentar lordosis pero no las conductas proceptivas como son brincar, mover las orejas hacia adelante y atrás, movimientos rápidos en zig zag y acercamiento y alejamiento del macho), al ser usada en la interacción con el macho, éste suele mostrar únicamente breve olfateo y escaso interés en ella. Por otro lado, cuando la hembra que se usa exhibe la conducta precopulatoria completa, todos los patrones precopulatorios antes mencionados son observados en el macho (Hlinak, 1983), por lo que podemos suponer que la conducta precopulatoria del macho está significativamente influenciada por el comportamiento de la hembra.

Los tratamientos farmacológicos que decrementan la conducta precopulatoria inhiben la conducta sexual (Paredes y Agmo, 1989). Se ha postulado que el pasar de la fase precopulatoria a la copulatoria es un aspecto importante y clave en la interacción sexual (Hlinak, 1986; Hlinak y cols., 1987).

Conducta copulatoria

La rata macho exhibe una serie de patrones motores bien definidos durante la fase copulatoria, éstos son:

- a) *Monta*.- El macho se para en sus miembros posteriores detrás de la hembra palpándola por los flancos y realizando movimientos pélvicos relativamente cortos. En ocasiones esta conducta puede ir seguida de acicalamiento genital.
- b) *Intromisión*.- Consiste en una monta con movimiento pélvico vigoroso y relativamente prolongado que termina en una desmonta que se caracteriza por un

fuerte salto hacia atrás. El patrón de intromisión puede ir o no acompañado de penetración vaginal. En la mayoría de los casos, esta conducta va seguida de acicalamiento genital.

c) *Eyacuación*.- Se presenta después de un cierto número de intromisiones. Se observa como el patrón de monta pero en este caso se da una inserción peneana que se mantiene por algunos segundos y va acompañada por la expulsión de líquido seminal y espermatozoides. La expulsión del esperma generalmente se acompaña por contracciones espasmódicas de la musculatura esquelética de los miembros delanteros y traseros que se caracteriza por un fuerte movimiento pélvico, así como de los músculos estriados de la región perineal, que incluyen al isquiocavernoso, bulbo esponjoso y esfínter anal. Después de la eyacuación el patrón de desmonta no es estereotipado pero siempre ocurre acicalamiento genital.

Al conjunto de patrones sexuales que presenta un macho, desde que entra en contacto con la hembra estímulo hasta que eyacula, se le denomina serie copulatoria.

Los patrones de monta se han relacionado principalmente con aspectos motivacionales, ya que los machos aumentan este patrón cuando su pene es anestesiado o cuando la vagina de la hembra es obstruida (Gray y col., 1976; Hardy y Debold, 1971), disminuyendo los patrones de intromisión y eyacuación, que se han considerado aspectos más ejecutorios de la conducta sexual.

Los parámetros comúnmente utilizados en la cuantificación de la conducta sexual de la rata macho son:

- 1) Latencia de monta.- Es el tiempo transcurrido desde que el macho entra en contacto con la hembra hasta la aparición de la primera monta.
- 2) Latencia de intromisión.- Es el tiempo transcurrido desde que el macho entra en contacto con la hembra hasta la aparición de la primera intromisión.

- 3) Latencia de eyaculación.- Es el tiempo transcurrido entre la primera intromisión y la eyaculación.
- 4) Intervalo posteyaculatorio.- Es el tiempo que transcurre entre la eyaculación y la primera intromisión de la siguiente serie copulatoria.
- 5) Número de montas preeyaculatorias.
- 6) Número de intromisiones preeyaculatorias.

En la conducta copulatoria el macho puede o no mostrar monta cuando empieza la serie copulatoria y el número de intromisiones varía entre 8 y 15 antes de eyacular; se considera que un macho experto puede eyacular entre 5 y 10 minutos después de haber entrado en contacto con una hembra receptiva (Larsson, 1956).

Conducta postcopulatoria

Después de terminar una serie copulatoria el macho entra en un período de acicalamiento intenso seguido por inactividad sexual. Se presenta un intervalo de 5 a 7 minutos en el que el macho no responde a la estimulación sexual (período refractario); a este período se le denomina intervalo posteyaculatorio (Larsson 1956).

Este período de inactividad se va incrementando en las series subsecuentes. Beach y Holtz-Tucker en 1959 sugirieron que el intervalo posteyaculatorio consta de 2 fases:

- a) Una larga en la que el período refractario es absoluto, no hay actividad sexual y el 75% del intervalo va acompañado de vocalizaciones ultrasónicas de 22 KHz (estas vocalizaciones se modifican de acuerdo al número de eyaculaciones previas. Barfield y Col. 1975; Larsson 1979; Sachs y Meisel, 1988)
- b) Una corta en la que el período refractario es relativo, en donde pueden presentarse montas si existe suficiente estimulación, por ejemplo, estimulación adecuada por

parte de la hembra (Beach, Holtz-Tucker, 1959) o estimulación eléctrica aplicada a los flancos del macho; este tipo de estimulación reduce el intervalo posteyaculatorio en un 25% (Barfield y Sachs, 1968).

Después de este período el animal puede reiniciar la cópula completando así varias series copulatorias. El número de intromisiones y la latencia de eyaculación se reducen en la segunda y tercera series copulatorias, incrementándose en las series subsecuentes. Se considera que un macho experto puede alcanzar de 8 a 12 eyaculaciones antes de quedar sexualmente exhausto (Hard y Larsson, 1968; Larsson, 1979).

1.1.2 Control hormonal de la reproducción en la rata macho

Como ya dijimos, la conducta sexual se expresa por la activación del sistema nervioso central y es modulada generalmente por hormonas producidas en las gónadas, que a su vez están controladas por la hipófisis. Se ha observado que la conducta copulatoria se presenta por primera vez y en forma completa cuando las gónadas empiezan a funcionar, lo que permite inferir que estas glándulas son determinantes para la expresión de la conducta sexual. De hecho, la extirpación de las mismas causa la desaparición de la conducta copulatoria (Michael y Wilson, 1974; Davidson, 1966a).

Durante los años sesenta se estableció la importancia de los esteroides gonadales durante la vida perinatal para que las conductas reproductoras se presenten en la edad adulta. Los esteroides sexuales actúan fundamentalmente de dos formas. La primera es organizacional, esto es, organizando en un período temprano del desarrollo las vías neuronales involucradas en las conductas reproductoras, siendo sus efectos irreversibles. La segunda forma de acción es de tipo activadora, esto es, cuando el organismo es adulto activan las vías neuronales ya organizadas para que las conductas que dichas vías controlan puedan inducirse (Phoenix y col., 1959). El efecto activador es facilitador o

permisivo ya que los esteroides gonadales incrementan la probabilidad de que las conductas reproductivas ocurran ante el estímulo apropiado (McEwen y col., 1970). La función activadora puede ser reversible, ya que la gonadectomía en ambos sexos lleva a una disminución de la conducta sexual, pero esta puede ser recuperada por la administración de las hormonas adecuadas (Thorton, 1986).

Los andrógenos resultan especialmente importantes en el macho, principalmente en la pubertad. De los andrógenos dependen los caracteres sexuales secundarios así como la maduración de los espermatozoides y expresión de la conducta sexual masculina.

El lóbulo anterior de la hipófisis participa en el control tanto de la producción de gametos como de las hormonas esteroideas a través de la secreción de gonadotropinas, hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH). Estas hormonas hipofisarias están bajo el control del hipotálamo mediante la secreción de ciertos factores liberadores (GnRh). El hipotálamo libera factores que llegan a la hipófisis anterior; ésta a su vez libera a las hormonas correspondientes (LH y FSH) que actúan en los testículos para la producción de testosterona (LH) y para la realización de la espermatogénesis (FSH).

La función testicular se regula por un sistema de retroalimentación negativa a través de la hipófisis y el hipotálamo. Por lo tanto, ante una disminución en la concentración de testosterona en la sangre se produce un aumento en la liberación de LH; como resultado de este aumento se origina una mayor producción de testosterona la cual es secretada por las células intersticiales de Leydig. Por otro lado este aumento inhibe la secreción de LH, permitiendo tener los niveles de testosterona en la sangre relativamente constantes. La unión de la hormona LH a receptores específicos en la membrana de las células de Leydig estimula la síntesis y secreción de testosterona, siendo éste el principal andrógeno producido en los testículos.

La expresión de la conducta sexual masculina en los mamíferos es modulada por la acción de los esteroides gonadales testiculares, de modo que se modifica al variar los

niveles de hormonas circulantes. La disminución en la actividad sexual tanto motivacional como consumatoria producida por la castración ha sido mostrada en varias especies de mamíferos entre los que se incluye la rata (Larsson, 1979; Sachs y Meisel, 1988). Pocos días después de la castración de la rata macho se observa un incremento en la latencia de intromisión. Conforme el tiempo transcurre se elimina la capacidad de los animales para eyacular, seguida de la desaparición del patrón de intromisión y finalmente, se elimina el patrón de monta (Davidson, 1966a; Stone, 1939). Los efectos inhibitorios de la castración sobre el patrón copulatorio se revierten de manera dependiente de la dosis por la administración de testosterona. Generalmente la conducta sexual reaparece después de varias inyecciones, las montas son las primeras en ser restablecidas, seguidas por las intromisiones y finalmente la eyaculación (Davidson, 1966b). También se ha descrito que una dosis alta de testosterona puede restaurar la cópula (Beyer y cols., 1976).

1.1.3 Aspectos motivacionales relacionados con la conducta sexual.

Resulta importante mencionar el papel que la motivación juega en la ejecución de la conducta sexual. A continuación se presentarán datos relacionados con aspectos motivacionales.

Los términos líbido y potencia sexual son frecuentemente aplicados en humanos, éstos se refieren en general a la distinción entre motivación y ejecución, o en terminología etológica, a la distinción entre los aspectos apetitivos y consumatorios de la conducta sexual animal (Davidson, 1980). Al igual que otras conductas motivadas, como la conducta de alimentación, la conducta de bebida, la construcción del nido y la agresión predatoria, entre otras, la conducta sexual se inicia cuando el animal presenta un estado de excitación intenso, tiene la propiedad de estar dirigida en tiempo y espacio a una meta específica (hembra) y finalmente, cuando se alcanza la meta, la actividad consumatoria

(eyaculación) da lugar a una disminución en la magnitud de la excitación, lo que asegura que la conducta motivada particular ocurra sólo en el tiempo apropiado.

A diferencia de las conductas reflejas, las cuales consisten en respuestas involuntarias, estereotipadas, provocadas por ciertos estímulos e involucran principalmente circuitos neuronales en el tallo cerebral y en la médula espinal, las conductas motivadas u orientadas a una meta son voluntarias, hasta cierto grado variables o impredecibles e involucran principalmente circuitos neuronales del cerebro anterior. Estas conductas son iniciadas por estímulos externos y/o internos e implican conductas de desplazamiento y acercamiento hacia la meta que requieren de tiempo y de una actividad motora compleja; además, son frecuentemente anticipatorias y como tal involucran señales cognitivas asociadas con aprendizaje y planeación. En general, la motivación se ha definido como un estado que impulsa a un individuo a obtener metas particulares (Swanson, 1988/89).

Las conductas motivadas se dividen en dos grandes clases: las que se relacionan principalmente con la sobrevivencia del individuo, como la conducta exploratoria, la conducta de alimentación, la conducta de agresión y las que se relacionan con la adecuación Darwiniana (difusión de los genes en la descendencia), entre las cuales se incluye a la conducta sexual y a la conducta maternal.

La expresión de las conductas motivadas incluye tres fases secuenciales:

- 1) La fase de iniciación, la cual puede ser inducida por deficiencias fisiológicas, señales sensoriales estereceptivas o información cognitiva.
- 2) La fase de procuración, que consiste en la excitación general asociada a la ejecución de conductas de desplazamiento, a la información sensorial estereceptiva, a la utilización de experiencias pasadas y aprendizaje y a respuestas viscerales que regulan los procesos homeostáticos.
- 3) Y finalmente la fase consumatoria que incluye la realización de respuestas motoras preprogramadas (como el lamer, masticar y deglutir en la conducta de ingesta),

retroalimentación sensorial (como gusto y olfato), mecanismos de saciedad que están involucrados en la terminación de la respuesta, así como mecanismos de reforzamiento que predisponen la conducta futura del animal dependiendo de las consecuencias de las respuestas pasadas (Swanson, 1988/89).

Sachs y Barfield (1976) definieron la motivación sexual como la magnitud de excitación sexual momentánea del animal en relación a un umbral y usan de manera equivalente los términos de motivación sexual y excitación sexual. De este modo, la aproximación de la excitación sexual a un umbral (por ejemplo para iniciar la cópula o para lograr la eyaculación) es determinada por la excitabilidad intrínseca del macho y por fuentes de estimulación externas (Sachs y Barfield, 1976). Las condiciones que facilitan la excitación sexual en las ratas macho incluyen la presencia de una hembra y otros estímulos asociados con el apareamiento, como estímulos genitales y propioceptivos durante la ejecución de los actos copulatorios. Así la orientación del macho hacia la hembra, el olfateo, la investigación anogenital, la persecución y las respuestas de monta forman parte de la cadena de conductas apetitivas que conducen a los actos consumatorios de intromisión y eyaculación. Aunque las intromisiones son respuestas preliminares en la secuencia conductual que da lugar a la eyaculación, de acuerdo con la definición de Bermant (1965) adoptada también por Kurtz y Adler (1973), las intromisiones por sí mismas pueden considerarse como respuestas consumatorias. Los movimientos pélvicos iniciales antes de la inserción peneana (montas) permiten localizar el orificio vaginal y la ejecución de tales movimientos se relaciona con la conducta apetitiva. Por otro lado, el movimiento pélvico profundo y la conducta de retiro de la intromisión constituyen partes del componente consumatorio.

La castración no solo disminuye la conducta del coito, sino también los aspectos motivacionales de la conducta sexual. En experimentos en donde se tiene acceso a un macho sexualmente activo o a una hembra sexualmente receptiva (pruebas de preferencia sexual), una rata macho intacta pasa significativamente más tiempo con una hembra en

estro. En cambio después de la castración esta preferencia declina rápidamente, pero puede ser restaurada con el tratamiento de testosterona (Hetta y Meyerson, 1978). Estos autores sugirieron que otras hormonas o sustancias endógenas podrían contribuir a controlar la motivación sexual. La implantación de pequeñas cantidades de testosterona en el área preóptica media (APM), puede restablecer la conducta sexual en ratas macho castradas (Davidson, 1966b; Johnston y Davidson, 1972). Es probable que una de las funciones más importantes (desde el punto de vista de la conducta sexual), de los receptores hormonales a testosterona en el APM sea la elevación de la motivación sexual.

Por otro lado, investigaciones previas han mostrado que la ejecución sexual en varias especies de vertebrados es aumentada por el simple hecho de ver la actividad copulatoria de otros machos, antes de ser colocados con una hembra receptiva. Esto a podido ser demostrado en ratas (Hard y Larsson, 1969), toros, cabras, caballos y cerdos (Kerruish, 1955; Pickett y col., 1977; Hemsworth y Galloway, 1979; Blockey, 1981; Mader y Price, 1984; Price y col., 1984). Sin embargo también se a mostrado, que esta exposición, no tiene ningún efecto en borregos (Price y col., 1998).

Aún cuando en la interacción sexual de la rata macho se han reconocido algunas situaciones conductuales que son indicadoras de motivación sexual, él poder medir el grado de motivación que presenta un sujeto ha constituido una gran dificultad. Por otro lado, es poco lo que se conoce acerca de las estructuras neurales responsables de la integración sensorial exteroceptiva y propioceptiva necesaria para provocar un estado de excitación sexual que impulse al macho a realizar la actividad copulatoria.

Es importante la participación que el sistema nervioso central tiene en la realización de la conducta sexual. Por tal motivo, a continuación revisaremos la importancia del sistema vomeronasal para el procesamiento de claves quimiosensoriales y el efecto que han tenido las lesiones en diferentes estructuras cerebrales sobre la conducta sexual masculina.

1.2 Importancia del sistema vomeronasal y claves quimiosensoriales

En machos de vertebrados, el olfato juega un papel importante para detectar y elegir a la pareja sexual. Los roedores machos emplean principalmente el olfato para detectar las feromonas de las hembras, de esta manera determinan si se encuentran sexualmente receptivas y dependiendo de esta información copulan o no con ellas.

Dentro del sistema olfatorio aparecen dos subdivisiones (Fig. 2), el sistema olfatorio principal (SOP) y el sistema olfatorio accesorio o sistema vomeronasal (SVN). Scalia y Winans (1975), sugirieron por primera vez, que estos dos sistemas podrían estar especializados en distintas funciones al comprobar que ambos sistemas cuentan con patrones de conectividad diferentes. Algunas de las conexiones del SOP y del SVN fueron descritas primero en el conejo (Winans y Scalia, 1970). Trabajos posteriores terminaron de describir las conexiones de estas dos redes neurales y las confirmaron en otras especies.

La diferencia funcional entre los dos sistemas olfatorios propuesta inicialmente por Winans y Scalia en 1975, no sólo es respaldada por los diferentes patrones de conectividad neural que presentan, sino también por el tipo de sustancias a las que cada sistema es capaz de responder. Mientras que el SOP aparece como un analizador molecular más general, el SVN, a través de sus receptores situados en el órgano vomeronasal (OVN), está especializado en captar feromonas no volátiles, de alto peso molecular y de contenido proteico que emiten los individuos. Tras ser detectado por otro miembro, estas feromonas producen cambios conductuales o fisiológicos en éste. La comunicación a través de feromonas es primordial para que una serie de conductas, entre las que cabe destacar las reproductoras, se lleven a cabo (Halpern, 1987; Meredith, 1983/1991; Wysocki, 1979; Wysocki y Meredith, 1987)

A través de numerosos estudios se ha demostrado que el OVN regula la acción feromonal involucrada en el mantenimiento de la conducta sexual tanto masculina como femenina (Commins y Yahr, 1984; Emery y Sachs, 1976). Además de mecanismos feromonales primarios que afectan la gestación (Halpern, 1987; Bellringer y cols., 1980),

el ciclo estral (Ingersoll,1981) y la conducta materna (Fleming y cols.,1979), Segovia y Guillamón en 1993, describieron que este sistema es indispensable para la conducta sexual en mamíferos. En la rata, esta vía de proyección vomeronasal es sexualmente dimórfica. Varias investigaciones demuestran la importancia de las diferentes estructuras que componen el sistema vomeronasal en el control neural de la conducta sexual. Dentro de ellas destaca el área preóptica media (APM), por lo que será analizada en un apartado al final de este capítulo.

1.2.1 Organización anatómica del sistema vomeronasal

La conducta reproductora y/o los cambios neuroendócrinos de ambos sexos se ven facilitados por claves feromonales que son detectadas por neuronas bipolares que conforman los receptores del órgano vomeronasal (OVN), el cuál proyecta sus axones al bulbo olfatorio accesorio (BOA). El BOA proyecta sus eferencias a través del tracto olfatorio accesorio, integrado en el tracto olfatorio lateral, hasta el núcleo del tracto olfatorio accesorio (BAOT), así como a los núcleos medial (Me) y posteromedial cortical (PMCo) de la amígdala. Un componente post-comisural de la estría terminal es la vía a través de la cual la información vomeronasal llega hasta el núcleo de la cama de la estría terminal medial (NCET) y continua hacia el área preóptica media del hipotálamo anterior (APM/HA), (Fig.2) (De Olmos y cols, 1978; De Olmos y cols, 1985; Kevetter y Winans, 1981; Kretter y Price, 1978; Ottersen, 1982; Scalia y Winans, 1975).

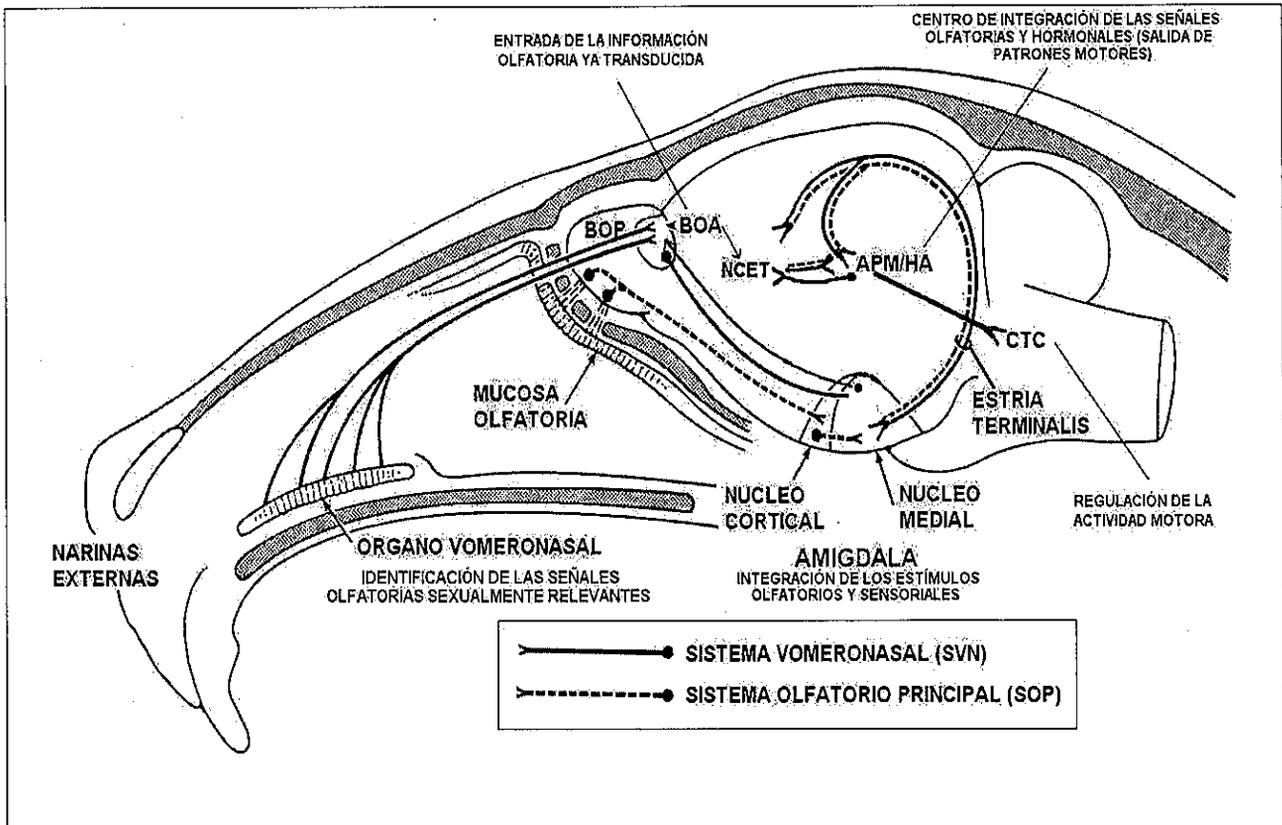


Fig.2 Representación esquemática del Sistema Olfatorio Principal y del Sistema vomeronasal y sus proyecciones en la rata macho. Bulbo olfatorio principal (BOP), bulbo olfatorio accesorio (BOA), núcleo de la cama de la estría terminal (NCET), área preóptica media del hipotálamo anterior (APM/HA). Adaptado de Baum, 1992.

El sistema vomeronasal se encuentra constituido por los siguientes elementos:

- **Organo vomeronasal (OVN):** Este órgano está constituido por quimiorreceptores fusiformes que se encuentran localizados bilateralmente en la parte más ventral del septum nasal. El neuroepitelio del OVN es el encargado de la transducción de las señales quimiosensoriales a potenciales de receptor.

La interacción de las feromonas en el epitelio modifica la secreción de gonadotropinas. Para la detección de un estímulo, el OVN promueve su transporte a través del neuroepitelio sensorial por un proceso de bombeo, debido al hecho de que el OVN se

interconecta con una serie de estructuras que facilitan el transporte de pequeñas cantidades de partículas no volátiles desde el medio ambiente al lumen del órgano (Larriva-Sahd y Matsumoto, 1994). Estas moléculas desempeñan un papel importante en la regulación de la atraktividad (Halpern, 1987; Romero y cols., 1990), sobre los efectos de las hormonas primarias (Wysocki, 1979 y 1987) y facilitando la conducta copulatoria en roedores de ambos sexos (Powers, 1975; Meredith, 1986).

- Bulbo olfatorio accesorio: Es una estructura que descansa en la porción dorsocaudal del bulbo olfatorio principal. El nervio del órgano vomeronasal transmite información desde el OVN al glomérulo del bulbo olfatorio accesorio (BOA) (Paxinos, 1995). El BOA tiene proyecciones directas al núcleo del tracto olfatorio accesorio y a la amígdala media (AMGm), específicamente a los núcleos cortical medial y posterior. Las neuronas del BOA expresan receptores a esteroides (Shughrue y cols. 1997), los cuales pueden ser modulados directamente por hormonas circulantes. El desarrollo de esta estructura se encuentra influenciada por esteroides gonadales (Roos y cols., 1988), y se ha observado que es más grande en la rata macho que en la hembra. El BOA se encuentra relacionado con la inhibición de la conducta sexual femenina en la rata macho, en funciones endocrinas, habituación, agresión, entre otras (Edwards, 1974).
- Amígdala medial: La amígdala (AMG) colinda con la parte final rostral del hipocampo y el límite anterior del asta temporal del ventrículo lateral (Price y cols., 1987). La AMG medial es un núcleo cuyas neuronas son el blanco para los andrógenos y estrógenos (Simerly, 1990; Stumpff, 1982). Esta estructura se ve involucrada en una gran variedad de conductas y funciones reguladoras (emoción, memoria, modulación de los sistemas autónomos y neuroendócrinos y en conductas sociales como la reproducción y la agresión) (Segovia y Guillamón, 1993; Paxinos, 1995).
- Núcleo de la cama de la estra terminal: El núcleo de la cama de la estra terminal (NCET) es una estructura del cerebro anterior que es una masa prominente de materia

gris rostral al núcleo olfatorio y caudal a ciertos componentes del complejo amigdalóide que forma parte del cerebro anterior (Johnston, 1923). Esta compuesto por cuatro divisiones mayores que pueden distinguirse a lo largo del gradiente antero posterior (De Olmos y col.,1978; Ju y Swanson, 1989). Este núcleo ha sido considerado como un centro olfatorio secundario.

- Área preóptica media: La organización anatómica del área preóptica media se explicará posteriormente en el apartado 1.4.

1.2.2 Estudio de lesiones del sistema vomeronasal en el control de la conducta sexual.

Varias investigaciones demuestran la importancia de las diferentes estructuras que componen el sistema vomeronasal en el control neural de la conducta sexual.

Hasta el momento se ha descrito la conducta sexual de la rata macho, el control hormonal sobre ésta y la importancia de las claves quimiosensoriales junto con el sistema vomeronasal para que se despliegue la conducta sexual. Sin embargo ha faltado mencionar los efectos que presentan las lesiones y la estimulación eléctrica en algunas regiones del cerebro sobre la actividad de esta conducta.

Algunos estudios se han enfocado a tratar de encontrar el posible sustrato neural necesario para la conducta sexual. Así, se han lesionado y estimulado diferentes áreas cerebrales. A continuación se describirán algunas evidencias, con este enfoque, que involucran a diferentes regiones del sistema de proyección vomeronasal en el control de la conducta sexual.

- *Organo Vomeronasal*.- Cuando a ratas macho sexualmente expertas se les remueve el órgano vomeronasal se observa un incremento en la latencia a la primera intromisión, así como un decremento en la tasa de intromisiones, lo cual genera latencias de

intromisión largas, pero fuera de estos parámetros todos los machos que han copulado son capaces de eyacular (Saito y Moltz, 1986).

- *Bulbo Olfatorio.*- Las lesiones a lo largo de la vía olfatoria producen alteraciones en la conducta de apareamiento (Heimer y Larsson, 1967). Al remover el bulbo olfatorio en ratas macho, se reduce el número de animales que eyacula. Esta alteración en la eyaculación es generada por una incapacidad de algunos machos para iniciar la copulación (Larsson, 1969, 1975) así como también una incapacidad para mantener la copulación una vez iniciada (Meisel y cols., 1980). Bermant y Taylor en 1969 demostraron que los efectos inhibitorios sobre la conducta sexual, producidos por lesiones del bulbo olfatorio, se reducen si los animales han tenido experiencia sexual antes de la lesión (haber eyaculado por lo menos una vez con una hembra receptiva). Estos resultados sugieren que la experiencia sexual parece ser también una variable importante en los efectos observados después de lesionar el bulbo olfatorio.

Así mismo, los efectos conductuales de la bulbectomía pueden reflejar una disrupción de la entrada tónica hacia el cerebro anterior que tiene poco o nada que ver con el deterioro sensorial olfatorio que sucede a la extracción del bulbo (Edwards y cols., 1990). Un resultado más dramático en la pérdida de la conducta sexual, se obtiene al lesionar bilateral y conjuntamente al bulbo olfatorio accesorio y principal. Con esta lesión se anula la conducta sexual (Winans y Powers, 1977).

Los efectos de la bulbectomía en la preferencia de pareja y copulación pueden ser consecuencia de una capacidad severamente deteriorada para percibir claves quimiosensoriales sexualmente relevantes, que impiden al macho tener la habilidad para hacer clasificaciones dependientes del olor de sus coespecíficos como posibles parejas sexuales (Edwards y col., 1990).

- *Amígdala.*- Lesiones en esta estructura causan un decremento en la actividad sexual (Schwartz y Kling, 1964). Las lesiones del núcleo corticomédial de la amígdala (AMG) causan un aumento en la latencia de eyaculación y reducen el número de

eyaculaciones (Giantonio y cols., 1970). Por otro lado, Harris y Sachs demostraron en 1975 que las lesiones en la región antes mencionada producen también un incremento en el número de intromisiones preeyaculatorias y fatiga sexual después de pocas eyaculaciones en comparación al grupo control (Harris y Sachs, 1975). Lesiones de otras áreas de la amígdala como la basolateral no producen alteraciones sobre la conducta sexual.

Se propone que la amígdala recibe información de los nervios sensoriales de la región genital. Por lo tanto la lesión de esta estructura resulta en una sensibilidad genital inadecuada que induce una inhibición de la conducta (Cain, 1974).

- *Núcleo de la cama de la estría terminal (NCET)*.- Las lesiones del núcleo de la cama de la estría terminal aumentan significativamente el número de intromisiones y la latencia de eyaculación (Emery y Sachs, 1976; Giantonio y cols., 1970; Valcourt y Sachs, 1979). Los efectos de estas lesiones son similares a las producidas al lesionar la amígdala córtico medial, lo cual sugiere que el NCET sirve como relevo de información desde la amígdala a otras áreas como es el APM (Benjamin y col., 1982). Se ha postulado que el NCET y la amígdala córtico medial contribuyen en la ejecución de la eyaculación e integran el sistema neural que controla el reinicio de la conducta después de la eyaculación (Emery y Sachs, 1976).
- *Área preóptica media (APM)*.- Los efectos de las lesiones del APM se discutirán posteriormente en la sección 1.4.

Estas estructuras se encuentran interconectadas formando así una vía multisináptica que procesa las señales feromonales de relevancia socio-sexual, que son detectadas primero por receptores en el órgano vomeronasal y transmitidas al sistema vomeronasal (Scalia y Winans, 1975).

1.3 Otras estructuras cerebrales involucradas en la conducta sexual

- *Hipotálamo*.- Esta estructura ha sido involucrada en la regulación de funciones corporales y emocionales. Lesiones en el hipotálamo posterior y en los cuerpos mamilares producen atrofia gonadal, suprimiendo la conducta sexual, mientras que lesiones en la región lateral anterior de esta estructura no la afectan.
- *Hipocampo*.- Lesiones totales de esta estructura causan una disminución en la latencia de monta e intromisión; en cambio lesiones dorsales y neocorticales del hipocampo no alteran la conducta sexual (Deswurry, Goodman, Sallis y Bunnell, 1968).
- *Campo tegmental central (CTC)*.- Edwards y Einhorn (1985) hacen notar que las lesiones del CTC, localizado en el mesencéfalo, prácticamente eliminan la actividad copulatoria y disminuyen la preferencia por hembras sexualmente receptivas. En este sentido las lesiones al CTC tienen los mismos efectos que el daño en el APM y el hecho de que los machos no manifiesten conducta copulatoria se debe, aparentemente, a una disminución en la motivación sexual como resultado de las lesiones. Por otro lado Giordano y col., en 1998 demostraron que en el caso de lesiones en el CTC, la pérdida de la conducta sexual se debe a una inhibición generalizada de conductas y no únicamente a una disminución en la motivación sexual. Como ya se había mencionado, Davidson (1966a) y Johnston y Davidson (1972), demostraron que implantes de testosterona en el APM bastan para restablecer la conducta sexual en machos castrados, por lo que resulta poco probable que el CTC tenga importancia significativa desde el punto de vista de la acción hormonal en relación con la motivación y la conducta sexual. Es más probable que sea la testosterona la que actúe sobre células sensibles a hormonas en el APM, elevando así la motivación sexual (efecto que puede llevarse a cabo a través de neuronas eferentes hacia el CTC).

1.4 Área preóptica media del hipotálamo anterior (APM/HA)

Los efectos más dramáticos que se han reportado sobre la pérdida de la conducta sexual han sido producidos por lesiones bilaterales del área preóptica media del hipotálamo anterior (APM/HA).

El APM/HA se localiza entre la porción caudal del quiasma óptico y la comisura anterior (Fig. 3), tiene como borde rostral y caudal a la lámina terminal y la división media del NCET respectivamente. Las neuronas del APM/HA concentran receptores de andrógenos y estrógenos para esteroides gonadales (Pfaff y Keiner, 1973). El APM es una estructura que mantiene diversas conexiones con diferentes partes del cerebro, por tal motivo se ha implicado en diversas funciones (regulación endocrina de la gonadotropina pituitaria, liberación de prolactina, termoregulación, conducta materna y sexual (Chiba y Murata, 1985; Conrad y Pfaff, 1976; Simerly y Swanson, 1988; Simerly y cols., 1986).

El APM/HA forma conexiones con varias regiones cerebrales. Se han identificado conexiones recíprocas (tanto aferentes como eferentes) entre el APM/HA y el septum lateral, el NCET, la amígdala medial, varios núcleos hipotalámicos (lateral, paraventricular, ventromedial y arcuato), el giro central, núcleo del raphe (dorsal y medio), el área ventral tegmental y el núcleo del tracto solitario (Chiba, T y Murata, Y, 1985; Conrad, L y Pfaff, D, 1976; Simerly y col., 1986, 1988). Otras vías eferentes importantes del APM/HA llegan a todas las regiones de la zona periventricular del hipotálamo, núcleo acumbens, caudado putamen, pálido ventral y el campo tegmental central.

En el control de la conducta sexual masculina se encuentran involucradas vías aferentes al APM/HA desde el órgano vomeronasal, las cuales transmiten información quimiosensorial vía el bulbo olfatorio accesorio (BOA), la AMGm y la porción encapsulada del NCST (Scalia, y Winans, 1975)

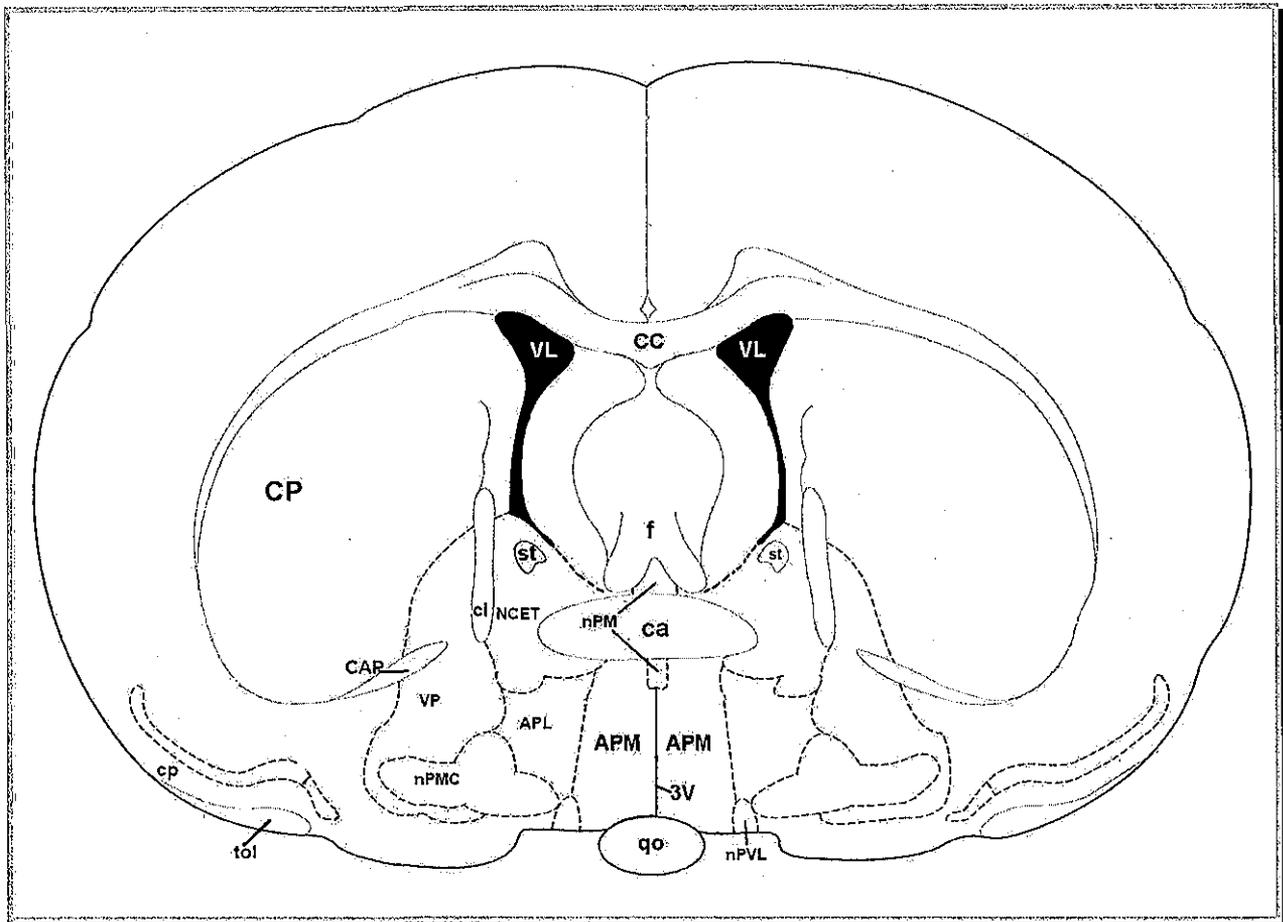


Fig. 3 Representación esquemática del área preóptica media (APM). Tercer ventrículo (3V), quiasma óptico (qo), comisura anterior (ca), núcleo preóptico medio (nPM), núcleo preóptico ventro lateral (nPVL), área preóptica lateral (APL), núcleo preóptico magno celular (nPMC), palidum ventral (VP), núcleo de la cama de la estria terminal (NCET), fórnix (f), estria terminal (st), cuerpo calloso (cc), ventrículo lateral (VL), caudado putamen (CP), comisura anteroposterior (CAP), corteza piriforme (cp), tracto olfatorio lateral (tol). (Lámina modificada de Paxinos y Watson, 1986).

La importancia del APM/HA en el control de la conducta sexual se deriva de varias líneas de investigación: la inducción de la conducta sexual en machos previamente no copuladores después del kindling (un modelo de plasticidad neuronal) en el APM/HA (Paredes y col., 1990a), la recuperación paulatina de la conducta sexual por trasplante de

tejido cerebral fetal después de lesiones del APM/HA (Paredes y col., 1990b), la facilitación de la conducta sexual por estimulación eléctrica del APM/HA (Paredes y Agmo, 1992). Observaciones detalladas de las interacciones socio-sexuales de las ratas macho lesionadas en el APM/HA revelan que la persecución de la hembra se reduce significativamente (Paredes y col., 1993a). Esos trabajos comprueban la importancia del APM/HA en la regulación de la conducta sexual masculina (para una revisión ver Paredes y Baum, 1997).

1.4.1 Lesiones en el Área Preóptica Media.

Los primeros estudios sobre lesiones en el APM se iniciaron con los trabajos de Brookhart en 1941, quien reportó pérdida de la conducta sexual en conejillos de indias después de lesiones de esta parte del diencefalo. Posteriormente fue reportado por Hillarp y col., en 1954 y Soulairac y Soulairac en 1956. En estos trabajos fue evidente que la conducta sexual masculina se elimina por completo cuando se realizan lesiones bilaterales grandes en el APM, mientras que cuando las lesiones son pequeñas la alteración de la conducta sexual es temporal (Heimer y Larsson, 1966/1967). Asimismo, las lesiones unilaterales en la misma región carecen de efecto (Lisk, 1968). Las alteraciones conductuales no dependen de un solo tipo de lesión ya que estos efectos se observan también con lesiones producidas con otras técnicas como son la aplicación de ácido iboténico (Hansen y cols., 1982a), radiofrecuencia (Lupo y cols., 1983) y cortes con navaja (Szechtman y cols., 1978). Efectos similares producidos por la lesión del APM se han descrito en diferentes especies como son: pollos, ranas, ratones, hámsters, cabras, gatos, perros, monos (Hart y Leedy, 1985; Larsson, 1979; Sachs y Meisel, 1988), lagartijas, víboras, peces y marmotas (revisión en Meisel y Sachs, 1994).

Las deficiencias en la conducta sexual producidas por lesiones bilaterales del APM no se asocian con alteraciones del eje hipófisis-gónadas ya que no se han detectado cambios

en los niveles plasmáticos de testosterona ni en el peso de los testículos y vesículas seminales o alteraciones de los mecanismos de erección o eyaculación (Heimer y Larsson, 1966/1967; Lisk, 1968, Lupo y cols., 1983; Stefanick y Davidson, 1987). Los tratamientos con testosterona y los procedimientos que inducen conducta sexual en ratas poco activas sexualmente, tales como manipulación del macho, reemplazo de la hembra y choques eléctricos al macho, no restablecen la conducta sexual en ratas con lesiones en el APM (Caggiula y cols., 1974; Heimer y Larsson, 1966/1967; Lisk, 1968; Stefanick y Davidson, 1987). Las deficiencias conductuales producidas por la lesión parecen ser permanentes ya que no se observa recuperación alguna de la conducta aún 8 meses después de la lesión (Ginton y Merari, 1977).

La recuperación de la conducta sexual en los machos lesionados en el APM sólo se ha observado usando dos estrategias. Hansen (1982) inyectó intraperitonealmente lisuride (agonista del receptor de catecolaminas). Con este tratamiento el 100% de los animales reanudaron su conducta sexual y el 50% eyaculó. Cuando estos mismos animales fueron tratados con solución salina, los animales no fueron capaces de copular. Es interesante mencionar que Hansen administró el lisuride diez días después de la lesión, mientras que en otros trabajos (Paredes y col., 1993), en los cuales los animales, fueron tratados con lisuride 15 semanas posteriores a la lesión, dichos animales no recuperaron la conducta sexual masculina. Lo anterior demuestra que los efectos del lisuride dependen del tiempo de su administración después de la lesión.

Paredes y col. (1990b), han transplantado tejido fetal hipotalámico (transplante homotípico) en el APM/HA lesionada, logrando que estos animales mostraran una recuperación de la conducta. Los machos lesionados que recibieron el transplante establecieron conexiones neuronales entre el tejido transplantado y el huésped, recuperando gradual y permanentemente la conducta sexual (la conducta se sigue presentando aún después de 8 meses del transplante). En un estudio posterior Paredes y col. (1993), inyectaron fluorogold (marcador retrógrado) en el CTC para evaluar la conectividad entre el tejido huésped y el transplante. En esos experimentos se encontraron células marcadas en el transplante de tejido hipotalámico en el APM, pero no con

transplantes de otros tejidos como por ejemplo de corteza, lo cuál indica que el tejido huésped efectivamente establece conexiones con el transplante.

Se han planteado diferentes hipótesis para tratar de explicar los mecanismos a través de los cuales la lesión del APM afecta la conducta sexual. Las ratas macho entrenadas para responder instrumentalmente y obtener acceso a una hembra receptiva, dejan de copular después de la lesión del APM, pero siguen mostrando la respuesta instrumental (Everitt y Stacey 1987). Con este procedimiento se ha demostrado que los animales con lesiones en el APM prefieren la compañía de una hembra receptiva o estar donde estuvo ésta, sugiriendo que el APM está involucrada en las respuestas motoras y no en las motivacionales relacionadas con la conducta sexual (Hughes y cols., 1990).

Por otra parte, existen datos que sugieren que al lesionar el APM se producen alteraciones en los mecanismos motivacionales. Por ejemplo, se ha demostrado que los animales con lesiones en el APM muestran menor preferencia por una hembra receptiva que los animales control. Esta reducción en la preferencia de una hembra en estro llega a ser progresivamente mayor a medida que aumenta el número de pruebas post-lesión y no se pudo revertir por administración con testosterona, sugiriendo que la conducta desaparece por una reducción en la motivación sexual (Edwards y Einhorn, 1985).

La tercera hipótesis sugiere que el APM está involucrado tanto en los mecanismos relacionados con la ejecución como con los de motivación de esta conducta. Por ejemplo, algunas ratas con lesiones en el APM despliegan montas e intromisiones sin alcanzar la eyaculación (Ginton y Merari, 1977). Cuando se realizan cortes dorsales y sagitales de las fibras que llevan información del o hacia el APM, se producen alteraciones conductuales diferenciales relacionadas con la ejecución e inicio de la conducta respectivamente (Szechtman y cols., 1978). La estimulación eléctrica del APM (Merari y Ginton, 1975) y la infusión de bicuculina en esta región (Fernández-Guasti y cols., 1985) reducen el número de intromisiones, la latencia de eyaculación y el intervalo posteyaculatorio. Además, aumenta el número de eyaculaciones en el tiempo de prueba. Resultados similares se han observado poco tiempo después de lesiones pequeñas del APM que

afectan tanto los mecanismos motivacionales como los de ejecución relacionados con la conducta sexual (Paredes y Agmo, 1992b).

Las vías eferentes provenientes del APM que atraviesan el haz medial tegmental (HMT) hacia el campo tegmental central (CTC) son un conducto a través del cual las células del APM que son sensibles a hormonas (Pfaff, 1968; Sar y Stumpf, 1973; Sheridan, 1978) podrían influir en la conducta sexual masculina.

En los animales se puede inferir la presencia de "motivación" sexual a partir del acto copulatorio. Sin embargo, no se puede concluir que la ausencia de la conducta copulatoria después de haber ocasionado daño cerebral (en forma experimental) tenga su origen en la falta de motivación sexual. Un ejemplo de esto es que sí bien las ratas macho con lesiones en el APM no copulan, sí continúan buscando a hembras receptivas y a menudo realizan montas mal orientadas sin movimiento pélvico (Brackett y Edwards, 1984; Hansen, 1982; Heimer y Larsson, 1966). Las ratas macho con lesiones en el APM no copulan pero sin embargo siguen emitiendo vocalizaciones ultrasónicas normalmente asociadas con el "cortejo" a la hembra (Bean y cols., 1981). Las lesiones del APM atenúan y a veces eliminan la actividad copulatoria en los monos macho, pero no afectan a la masturbación (Slimp y cols., 1978). Estas observaciones han llevado a algunos investigadores a sugerir que quizá el daño en el área preóptica inhiba el inicio o la ejecución del acto copulatorio sin necesariamente afectar el interés sexual, aunque esta idea nunca ha sido probada directamente (Hansen, 1982; Hansen y Drake, 1984; Slimp y cols., 1978).

Se ha demostrado que hurones macho gonadectomizados tratados con dosis altas de benzoato de estradiol (BE) prefieren en promedio interactuar con una hembra receptiva en lugar de un macho activo en pruebas de laberintos en forma de T. Por otro lado, las hembras tratadas con BE prefieren interactuar con el macho sexualmente activo (Stockman y col., 1985). Los hurones machos con lesiones excitotóxicas, que dañan únicamente neuronas del APM muestran una preferencia por un macho activo superior al

de los otros grupos de machos controles. Esta preferencia es parecida a la que muestran los hurones hembra independientemente de haber o no recibido una lesión preóptica (Paredes y Baum, 1995). Esta preferencia por los machos está asociada también a una reducción de la expresión de la conducta sexual masculina. Más aún, hurones macho que presentan una preferencia por la hembra receptiva en pruebas pre-lesión cambian su preferencia por un macho activo después de ser lesionados bilateralmente en el APM (Kendon y col., 1996). La preferencia por los machos activos tanto de las hembras control como de los machos con lesiones bilaterales del APM aumentó cuando los sujetos podían ver, oler y escuchar al animal estímulo pero no podían interactuar físicamente al tener una barrera de malla de alambre. Estos resultados sugieren que la preferencia de los hurones macho por una hembra receptiva depende de la integridad funcional de neuronas del APM. Cuando estas neuronas no están diferenciadas (como en las hembras) o destruidas (machos con lesiones bilaterales del APM) los sujetos son atraídos por claves quimiosensoriales del macho activo.

Esto también fue demostrado en ratas (Paredes y cols, 1998). En este trabajo los sujetos también son observados en una situación en la que tienen que escoger interactuar con una hembra receptiva o con un macho activo para evaluar sus preferencias sexuales, antes y después de una lesión electrolítica. Así se demostró que las hembras mantienen una preferencia por interactuar con un macho activo independientemente del tratamiento hormonal (benzoato de estradiol o propionato de testosterona). De manera similar la lesión del APM/HA no modifica la preferencia de las hembras por un macho activo. Por otro lado la lesión en los machos produjo una clara modificación de su preferencia sexual. Antes de la lesión los machos interactuaron más tiempo con la hembra receptiva pero después de la destrucción bilateral del APM/HA pasaron significativamente más tiempo interactuando con el macho activo independientemente del tratamiento hormonal.

A partir de lo anterior, podemos concluir que los estudios en hurones y en ratas demuestran que las lesiones en el APM de machos aumentan su preferencia por un macho activo, sugiriendo que neuronas de esta región son importantes en el procesamiento de las claves que permiten la interacción y preferencia por una pareja heterosexual.

Resumiendo, las lesiones bilaterales del APM, eliminan o disminuyen la conducta sexual en machos de varias especies, produciendo un cambio en la preferencia sexual en hurones y ratas. Además, no se ha detectado recuperación espontánea de la conducta y los tratamientos que inducen copulación en animales con poca actividad sexual, no inducen copulación en animales con lesiones en esta estructura.

Tomando en cuenta lo anterior, en el presente trabajo investigamos si la eliminación de la cópula y el cambio en la preferencia sexual en las ratas macho después de la lesión del APM/HA se debe a un déficit en la coordinación motora de estas ratas que les impide llevar a cabo la fase ejecutoria de la conducta sexual. Otro aspecto a evaluar es observar si estímulos motivacionales como el ver, escuchar y oler a una pareja de ratas copulando inducía nuevamente la cópula en los machos lesionados. Una tercera pregunta es analizar si existe un procesamiento diferente en comparación a los machos sin lesión en esta estructura, de las claves quimiosensoriales sexualmente relevantes, evaluando esto último por medio de la detección por inmunohistoquímica del producto del proto-oncogen c-fos. Por este motivo, en el siguiente capítulo revisaremos la información acerca del uso de Fos como marcador de actividad neuronal y específicamente como marcador ante estímulos sexualmente relevantes en la rata macho.

1.5 Retroalimentación entre estructuras del Sistema Vomeronasal

Los elementos del circuito vomeronasal que son esenciales para la copulación se aproximan a una cadena linear de neuronas. El bulbo olfatorio representa la unidad de entrada. El BOA recibe las señales quimiosensoriales que han sido transducidas en el órgano vomeronasal (para una revisión ver Wood y Newman, 1995). La amígdala medial es una unidad que transmite la entrada quimiosensorial del BOA al APM, el APM representa una unidad de salida altamente organizada para la expresión de la conducta

sexual masculina. Cada componente de este sistema es necesario para la actividad sexual. La destrucción del BO, amígdala o APM, afecta como ya vimos en diferentes grados la conducta sexual del macho. Estudios con trazadores han mostrado que la mayoría de las estructuras están bidireccionalmente conectadas, esto es especialmente cierto para estructuras cerebrales que responden a esteroides (Cottingham y Pfaff, 1986). Sin embargo no todas las conexiones bidireccionales son simétricas. Las conexiones aferentes y eferentes de la amígdala con el BOA y el APM son preferentemente hacia una dirección. El BOA es la mayor fuente de aferencias hacia la amígdala (Davis y cols., 1978), y la amígdala manda una proyección eferente densa al APM (Gomez y Newman, 1992); Canteras y cols., 1995). Sin embargo conexiones recurrentes del APM a la amígdala y de la amígdala al BOA, son limitadas (Simerly y Swanson, 1998; Gomez y Newman, 1992; Canteras y cols., 1995).

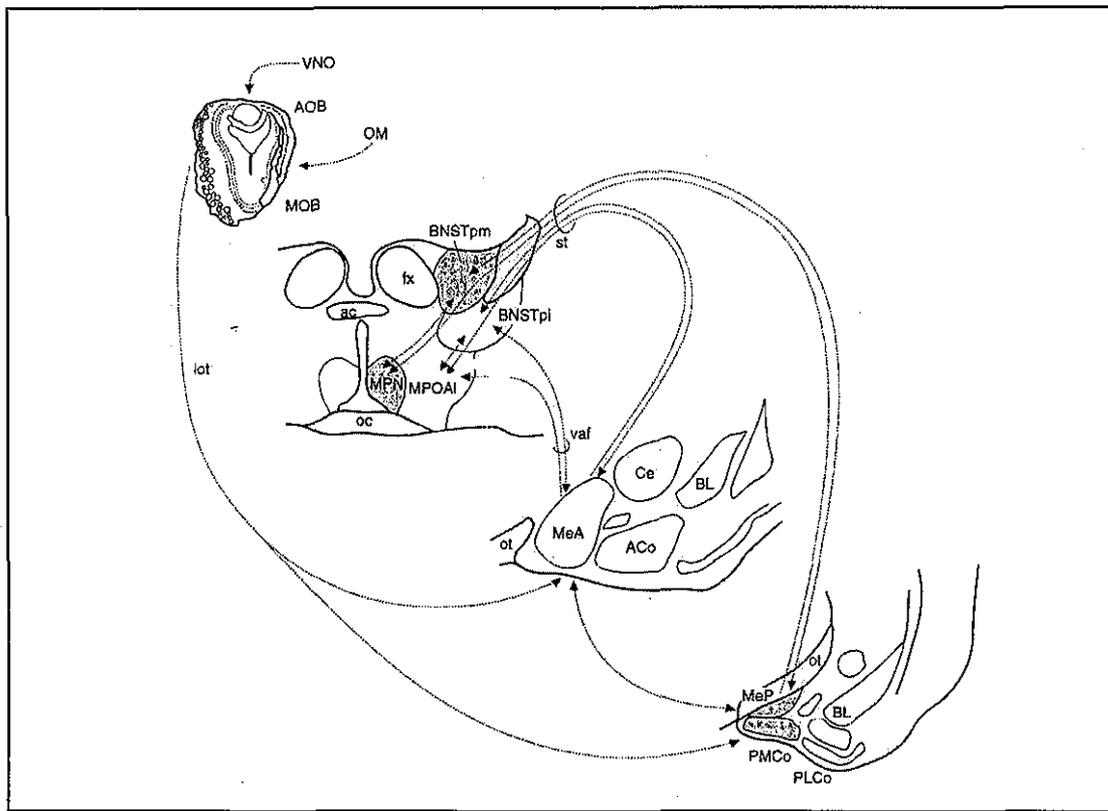


Fig. 4 Representación esquemática del Sistema Vomeronasal, donde se muestran todas las interconexiones existentes entre sus diferentes estructuras (Figura tomada de Wood, 1997).

CAPÍTULO II

C-FOS Y CONDUCTA SEXUAL

2.1 El gen temprano c-fos y estudios de conducta en el sistema nervioso

Los genes de respuesta temprana fueron originalmente descritos en el campo de la regulación del crecimiento. Estos son rápidamente inducidos por estímulos extracelulares y codifican proteínas necesarias para eventos que ocurrirán en la célula (Curran y Morgan, 1995). A la fecha han sido identificadas principalmente 4 proteínas de la familia Fos: c-Fos, FosB, Fra-1 y Fra-2 (Greenberg and Ziff, 1984; Zerial y cols., 1989; Cohen y Curran, 1988; Nishina y cols., 1990). Estas proteínas son codificadas por genes que contienen cuatro exones y tres intrones (van Straaten y cols., 1983). Poseen un cierre de leucina que promueve la heterodimerización con miembros de la familia Jun (c-jun, JunB y JunD) para formar un factor de transcripción llamado proteína activadora-1 (AP-1 por sus siglas en inglés, para una revisión ver Hughes y Dragunow, 1995).

Como ya dijimos este heterodímero (Fos/Jun) funciona como un factor de transcripción, el cual se une específicamente a una secuencia del ADN. Al unirse al ADN se activa el sitio AP-1, el cual regula la expresión de varios genes relacionados con el crecimiento, la reparación y la replicación del genoma. Fos y Jun son miembros de una gran familia de factores de transcripción, los cuales al coordinar grupos y subgrupos de genes posibilitan a las células para responder a las demandas ambientales.

Existen dos características de la expresión de c-fos que ponen a este gen de acción temprana como una excelente herramienta de mapeo:

1. Los bajos niveles de transcripción de c-fos bajo condiciones basales y

2. Su inductibilidad sobre un amplio rango de estimulación trans-sináptica/transcripcional.

En condiciones basales, el RNA mensajero (RNAm) de c-fos y la proteína Fos son muy bajos (Hughes y cols., 1992). En cultivos celulares como en varias regiones cerebrales en vivo el RNAm es inducido en un par de minutos después del estímulo y el pico se encuentra entre 30 y 60 minutos. El nivel máximo de la proteína Fos ocurre entre una y tres horas y desaparece gradualmente del núcleo celular entre 4 y 3 horas después del tratamiento (Sonnenberg y cols., 1989; Chan y cols., 1993; Imaki y cols., 1993; Ding y cols., 1994; Ikeda y cols., 1994; Cullinan cols., 1995; Kovacs y Sawchenko, 1996; Kovacks, 1998).

Se considera que la inducción de Fos refleja la actividad funcional de las neuronas (Sagar y cols., 1988; Dragunow y Faull, 1989; Duncan y cols., 1993). Sin embargo, áreas con altos niveles de actividad neuronal, por ejemplo corteza visual (Kaczmarek y Chaudhuri, 1997) o células neurosecretoras magnocelulares durante la succión (Fenelon y cols., 1993), no muestran una expresión significativa de c-fos; por lo tanto parece que la sola actividad no es suficiente para inducir la respuesta de este gen. Sin embargo recientemente se ha demostrado que la expresión de c-fos depende de las características temporales de los patrones de disparo de los potenciales de acción. En cultivos de células ganglionares de la raíz dorsal, incrementos grandes y sostenidos en el calcio intracelular o altos niveles de calcio separados por largos intervalos de disparo producen muy poca expresión de c-fos. La activación de este gen fue inversamente correlacionado con el intervalo de disparo de los potenciales de acción (Fields y cols., 1997).

A nivel de sistema, la estimulación de entradas sensoriales (aferencias), como la visual, a una intensidad normal no provoca la inducción de c-fos. Así mismo la estimulación en la corteza visual provoca expresión de c-fos solo después de un periodo de privación sensorial y cuando las ratas son expuestas a un objeto novedoso (revisión en Kaczmarek y Chaudhuri, 1997). Una estimulación auditiva a diferentes intensidades no

activa la expresión de c-fos comparado con una situación de ruido de fondo, pero esta expresión está activada de una forma dependiente de la intensidad en estructuras relacionadas a la audición (Campeau y Watson, 1997).

Sin embargo, se han observado diferencias en otras estructuras cerebrales: algunas áreas como los núcleos basolateral, medial y cortical de la amígdala y el tálamo anterodorsal y mediodorsal, así como la corteza piriforme, infralímbica y del cíngulo, expresan c-fos en respuesta a leves estímulos como la exploración de un ambiente novedoso (Hughes y cols., 1992; Cullinan y cols., 1995; Duncan y cols., 1995). Como veremos más adelante, en el sistema vomeronasal también se presenta la expresión de c-fos después de la estimulación por señales sexualmente relevantes de una hembra receptiva.

El patrón de expresión de Fos es específico al tipo de estímulo aplicado. Por ejemplo, en experimentos donde se inyectan ratas con una solución hipertónica y se sacrifican después de 30 min., se han localizado muchas células inmunoreactivas a Fos en el órgano subfornical, estructura circunventricular del cerebro involucrada en la regulación de los fluidos del cuerpo (Giovannelli y Bloom, 1992). De manera similar se ha observado en investigaciones sobre tareas motoras o hipertermia en ratas, que después del estímulo hay una gran cantidad de neuronas inmunoreactivas a Fos en regiones cerebrales implicadas con esos estímulos y no en otras áreas (Scammell y cols., 1993). Lo anterior nos pone de manifiesto que las regiones donde la actividad neuronal es detectada, por la expresión de la proteína Fos, depende del tipo de estímulo aplicado. Por lo tanto, la detección de las proteínas producidas por genes tempranos como Fos, refleja las regiones neuronales involucradas en el procesamiento neuronal de un estímulo determinado.

Existe un número de diferentes cambios que inducen la expresión de c-fos:

1. Factores neurotróficos
2. Neurotransmisores
3. Despolarización y

4. Incremento del flujo de calcio y elevación del calcio intracelular e intranuclear.

Así la detección inmunohistoquímica del producto del oncogen c-fos se ha utilizado ampliamente como un marcador de actividad neuronal que ocurre en respuesta a una gran variedad de estímulos homeostáticos o sensoriales por todas las características mencionadas anteriormente.

2.2 c-fos y conducta sexual

Se ha utilizado la detección de la proteína Fos como una técnica para medir la respuesta de los circuitos neuronales involucrados en el control de la conducta sexual, sobre todo la respuesta del circuito de proyección vomeronasal, a varios tipos de estímulos sexualmente relevantes en la rata, tanto en machos como en hembras (Paredes y cols., 1998). Algunos trabajos en los que se ha utilizado la expresión de esta proteína como un marcador inmunohistológico de actividad neuronal, sugieren que la rata hembra tiene un patrón sorprendentemente similar al de los machos en respuesta a claves feromonales derivadas de una hembra en estro (Bressler y Baum, 1996). En otro estudio, realizado por Wersinger y colaboradores en 1993, las ratas fueron sometidas a varios tipos de estímulo sexualmente relevantes, tanto en machos como en hembras gonadectomizadas y tratadas con estrógenos, y se observaron patrones idénticos de inmunoreactividad hacia Fos en la AMG medial posterior, el NCET el tegmento dorsolateral (TDL) y el APM.

Los resultados anteriores demuestran claramente que la detección de la proteína Fos después de la exposición a claves sexualmente relevantes permite evaluar el funcionamiento del circuito de proyección vomeronasal.

Por otro lado, Bakker y cols. (1995) demostraron que las claves quimiosensoriales de aserrín expuesto a hembras en estro aumentaban el número de neuronas inmunoreactivas

a Fos en la amígdala medial posterior, el NCET y el APM de ratas macho que habían sido castradas en la edad adulta y tratados crónicamente con estradiol. También observaron aumentos similares en machos que habían sido tratados neonatalmente con un inhibidor de la aromatasas, 1,4,6-androstriana-3,17-dione (ATD, la cual bloquea la masculinización del núcleo dimórfico sexual del APM). Además, cuando Bakker y cols. expusieron sujetos macho a camas de machos sexualmente activos, solo se activaron las áreas periféricas (BOA y amígdala media anterior). No se activaron las áreas centrales (NCET y APM).

Paredes y cols. (1998), demostraron que las ratas macho y hembras gonadectomizadas y tratadas con propionato de testosterona (PT) presentaban la activación del circuito vomeronasal a claves sexualmente relevantes evaluado por medio de la inmunoreactividad a la proteína Fos, mientras que los sujetos tratados con aceite no respondieron al olor de hembra receptiva.

La respuesta de las neuronas de este circuito a claves quimiosensoriales provenientes de machos es diferente en cada sexo, mientras que la respuesta a camas de hembras es igual en los dos sexos, y que la respuesta está condicionada a la existencia de un nivel hormonal mínimo.

Se debe mencionar que la disrupción quirúrgica de la aferencia vomeronasal que llega al cerebro, atenúa parcialmente el aumento de c-fos inducido por la cópula en diferentes partes del circuito de proyección vomeronasal (Dudley y cols., 1992; Fernandez-Fewell y cols. ,1994). Sin embargo no se ha estudiado el posible papel de las lesiones del APM, que causan una pérdida total de la conducta sexual, sobre la actividad neuronal del sistema vomeronasal en ratas macho.

CAPÍTULO III

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

3.1 Planteamiento del problema

La conducta reproductora se ve facilitada por claves feromonales que son detectadas por receptores del órgano vomeronasal, que a su vez transmite ésta información hacia el bulbo olfatorio accesorio, la amígdala, el núcleo de la cama de la estría terminal y el área preóptica media del hipotálamo anterior (APM/HA). La integridad neuronal del APM/HA es fundamental para la expresión de la conducta sexual, ya que lesiones extensas de esta región inhiben en forma permanente la expresión de esta conducta. Así mismo, se ha encontrado que estas lesiones disminuyen tanto la preferencia sexual como la preferencia olfatoria por una hembra receptiva en machos con previa experiencia sexual. Estas y otras evidencias ya descritas anteriormente sugieren que el APM/HA es un centro neural que integra los estímulos quimiosensoriales relevantes para la conducta sexual.

Por otro lado en estudios donde se ha utilizado el marcador de activación neuronal c-fos, se ha observado que la presentación de estímulos quimiosensoriales sexualmente relevantes provenientes de una cama de hembras en estro induce actividad neuronal en el bulbo olfatorio, el núcleo de la cama de la estría terminal, el APM/HA y la amígdala. Sin embargo se desconoce el posible efecto de las lesiones del APM/HA sobre el funcionamiento del sistema vomeronasal.

En el presente trabajo pretendemos evaluar por medio del gen de acción temprana c-fos, si las lesiones en ratas macho del APM/HA, producen un patrón de actividad neuronal diferente en el sistema de proyección vomeronasal en comparación con los animales controles.

3.2 Objetivos

- Analizar si las lesiones del APM/HA, que producen una inhibición completa de la conducta sexual, y una alteración por la preferencia de una hembra receptiva, alteran la activación neuronal del sistema vomeronasal, cuantificado por la expresión de la proteína FOS.
- Comprobar si pruebas motivacionales, utilizadas para aumentar la ejecución de la conducta sexual, pueden lograr una recuperación de ésta en ratas macho que previamente perdieron la conducta por lesiones bilaterales del APM/HA
- Determinar si las lesiones del APM/HA alteran la coordinación locomotora en ratas macho, para descartar que la falta de conducta sexual sea debida a un problema motor.

3.3 Hipótesis

- Se ha propuesto que el área preóptica media del hipotálamo anterior (APM/HA) participa en la integración de estímulos quimiosensoriales sexualmente relevantes provenientes de una hembra en estro. Estos estímulos provocan activación neuronal detectable por inmunohistoquímica para Fos, y se sabe existe una estrecha comunicación entre diversas estructuras del sistema vomeronasal, se propone que lesiones del APM/HA afectarán la activación neuronal de otras estructuras del Sistema Vomeronasal.
- Dado que el APM no participa en los aspectos motores de la conducta sexual, la lesión de esta estructura no afectará el desempeño de la coordinación motora en pruebas realizadas en un rodillo rodante.

- Como las lesiones del APM alteran la parte motivacional de la conducta sexual a las ratas lesionadas, éstas no lograrán recuperar la conducta sexual a pesar de ser estimuladas con la observación de otros machos copulando.

3.4 Sujetos

Se utilizaron 90 ratas macho de la cepa Wistar, alojados en el bioterio del Centro de Neurobiología, UNAM y cuyo peso era de 300 a 350 gr. Los animales fueron mantenidos bajo un ciclo artificial invertido de luz-obscuridad (12 horas luz-12 horas obscuridad), con una temperatura ambiente de aproximadamente 22 grados centígrados y teniendo libre acceso a comida y agua.

Las ratas hembra estímulo de la cepa Wistar que se utilizaron para las pruebas de conducta sexual fueron ovariectomizadas cuando menos una semana antes de ser usadas. Se inyectaron con 25 µg de benzoato de estriadol 48 hrs. antes a la prueba y con 1 mg de progesterona cuatro horas antes, con la finalidad de provocar un estado de receptividad y proceptividad adecuadas para la interacción sexual con el macho.

3.5 Aparatos

3.5.1 Cajas de conducta sexual

Son cajas de madera con frente de vidrio para facilitar la observación conductual y que miden 40 x 60 x 40 cm. Para observar la conducta sexual, las cajas contienen aserrín en el piso de la misma (Fig. 5).



Fig. 5 Caja con aserrín en el piso para la observación de la conducta sexual en las ratas macho

3.5.2 Cajas de coordinación motora

Para las pruebas de coordinación motora se utilizó un aparato de rodillo rodante (Smart Rod System V 1.70) con software basado en Windows de AccuScan Instruments, Inc. El aparato consiste de un rodillo de 70 mm de diámetro en una cámara de acrílico de 30.5 X 5.5 X 21 cm. (Fig. 6)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

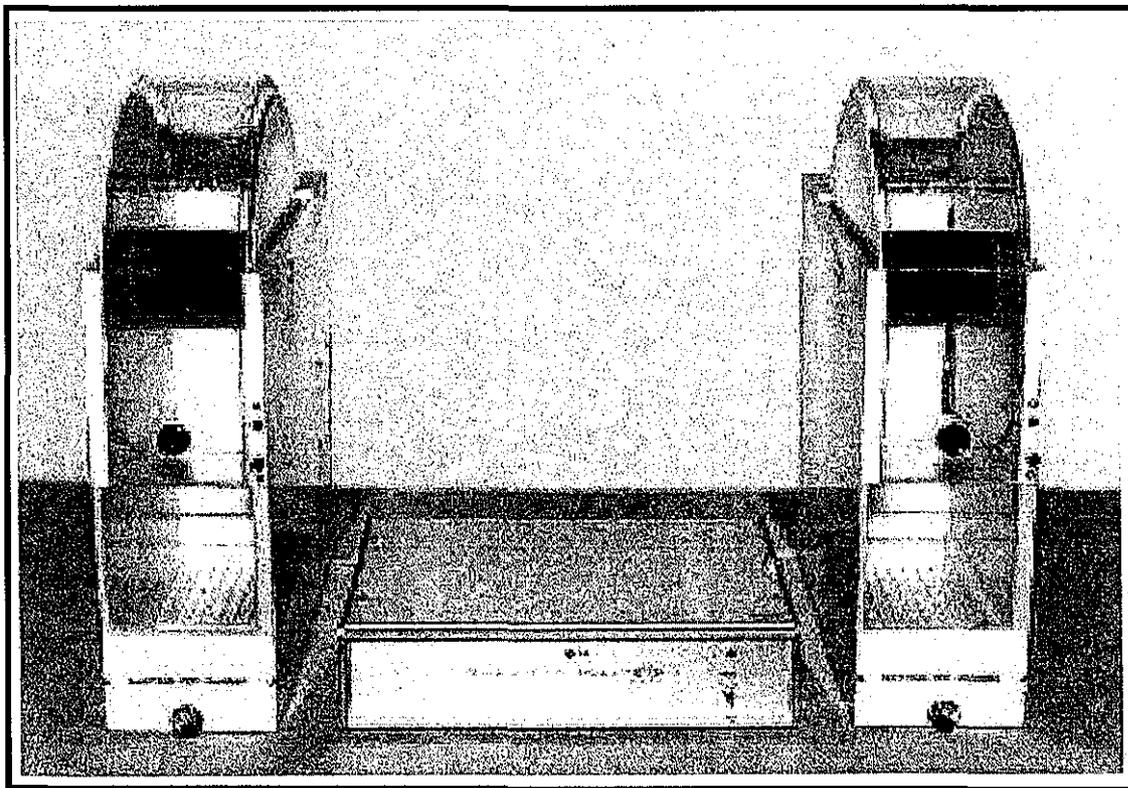


Fig. 6 Aparato utilizado para la prueba de coordinación motora

3.6 Drogas administradas a las ratas hembra

- Benzoato de Estradiol: 17-B-estradiol-3-Benzoato, (Sigma Chemical Company, USA). Se inyectó en una dosis de 25 μ g/rata, 48 horas antes de la prueba de conducta sexual en un volumen de 0.2 ml/rata.
- Progesterona: (Aldrich Chemical Company Inc., USA). Se inyectó en una dosis de 1mg/rata, 4 horas antes de la prueba de conducta sexual y 6 horas antes de las pruebas de preferencia olfatoria en un volumen de 0.2 ml/rata.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Las hormonas fueron disueltas en aceite de maíz comestible e inyectadas subcutáneamente.

3.7 Procedimiento experimental

Con el propósito de seleccionar a los sujetos para el estudio (n inicial = 90), cada rata macho debía eyacular por lo menos en 3 de 4 pruebas de conducta sexual (realizadas por lo menos con 3 días de diferencia cada una). Después de estas pruebas conductuales se obtuvieron 67 machos expertos. De estos, 56 sujetos fueron sometidos a cirugía para realizar la lesión bilateral electrolítica del APM/HA y 11 fueron sometidos a una lesión falsa del APM/HA. Una semana después de la lesión electrolítica o de la falsa lesión, los animales fueron registrados en tres pruebas, una por semana, de conducta sexual (bajo las mismas condiciones y parámetros antes descritos).

Después se realizó una prueba de coordinación motora a todos los sujetos y posteriormente se realizaron tres pruebas motivacionales. Por último se expusieron los machos a camas de aserrín de hembras en estro y después de 90 min. fueron perfundidos, para posteriormente realizar la histología y la inmunohistoquímica para FOS.

3.8 Pruebas conductuales y cirugía

Todas las observaciones conductuales se realizaron en el periodo obscuro del ciclo luz-obscuridad bajo luz roja.

PROCEDIMIENTO

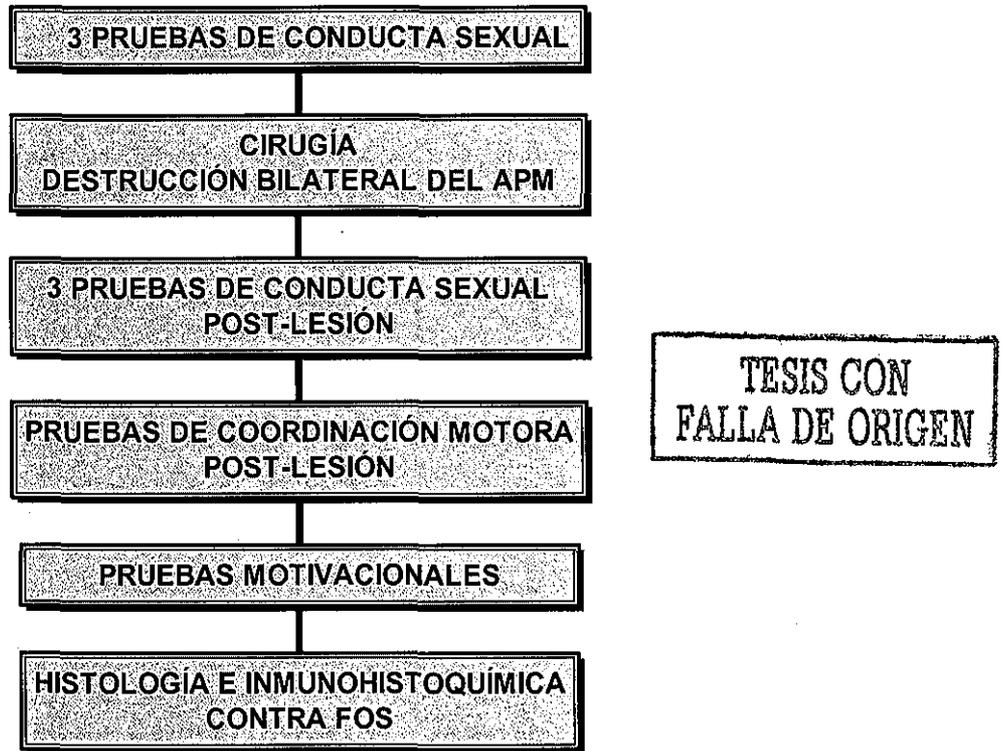


Fig. 7 Esquema del procedimiento seguido en este trabajo

3.8.1 Conducta sexual

En ésta prueba se coloca a la hembra receptiva (estímulo) 5 minutos antes de colocar al macho experimental en la caja de observación (Fig. 4). En cada observación se registraron los siguientes parámetros: latencia de monta (tiempo transcurrido desde que el macho se introduce en la caja donde se encuentra la hembra, hasta la aparición de la primera monta), latencia de intromisión (tiempo transcurrido desde que el macho se introduce a la caja hasta la aparición de la primera intromisión), latencia de eyaculación (tiempo transcurrido entre la primera intromisión y la eyaculación), intervalo posteyaculatorio (tiempo que transcurre entre la eyaculación y la primera intromisión de la segunda serie

copulatoria) y número de montas e intromisiones preeyaculatorias. La prueba terminaba al finalizar el intervalo posteyaculatorio. Si la rata no intrometía en la primera media hora o no eyaculaba durante el lapso de una hora, era retirada de la caja de observación.

3.8.2 Cirugía

Los animales recibieron una lesión electrolítica bilateral del APM. Fueron anestesiados con Ketamina (95 mg/Kg.) y xylazine (12 mg/Kg.). Se utilizó un electrodo de acero inoxidable, aislado excepto en la punta (0.5 mm). Para lesionar el APM, el electrodo fue ubicado en las siguientes coordenadas: 0.5 mm lateral a la línea media a la altura de Bregma y 7.5 mm de profundidad a partir de la dura madre. Se administró una corriente de 0.55 mA durante 30 seg., con un lesionador Ugo Basile 3500.

3.8.3 Pruebas de Coordinación Motora

Los animales fueron colocados en el rodillo de la caja de acrílico del Smart Rod System y fueron sometidos a una prueba de entrenamiento dos veces al día (una en la mañana y otra en la tarde (ver tabla 1). Esto fue repetido 3 veces, con un intervalo de 3 días en cada sesión. Al siguiente día de la última prueba de entrenamiento se realizó la prueba de coordinación motora (ver tabla 2), midiendo el número de caídas que presentaba el animal en un intervalo de 3 minutos. Posteriormente se midió al día siguiente la latencia de caída y la velocidad, en revoluciones por minuto (r.p.m.), a la cual el sujeto termina la prueba motora (ver tabla 3).

En seguida se explica el esquema que fue utilizado para el entrenamiento de las ratas y para las pruebas finales.

- Día 1 Dos pruebas (mañana y tarde)
- Día 3 Dos pruebas (mañana y tarde)
- Día 5 Dos pruebas (mañana y tarde)

DURACIÓN (seg)	VELOCIDAD FINAL (r.p.m.)
5	5
10	10
15	15
10	10
5	5
5	0

Tabla 1 Esquema utilizado para el entrenamiento de la coordinación motora.

- Día 6 Prueba de número de caídas en 3 min.

DURACIÓN (seg)	VELOCIDAD FINAL (r.p.m.)
1	5
180	10
1	0

Tabla 2 Esquema utilizado para realizar la prueba de número de caídas en 3 minutos.

Día 7 Prueba de velocidad del rodillo y latencia a la cual el sujeto termina la prueba

DURACIÓN (seg)	VELOCIDAD FINAL (r.p.m.)
10	5
20	10
30	15
30	-15
20	10
10	5
5	0

Tabla 3 Esquema utilizado para la prueba final, en la latencia de caída y velocidad del rodillo en la que el sujeto termina la prueba.

3.8.4 Pruebas Motivacionales

Estas pruebas consistieron en colocar una hembra receptiva con un macho estímulo en la caja de conducta sexual y dejar que interactuaran por 2 min., después de los cuales era introducido el macho experimental para que este pudiera ver, oler, escuchar y tener contacto físico con la pareja estímulo. Al introducir al macho experimental se registraba la conducta sexual que desplegaba con la hembra estímulo.

Esta prueba se realizó tres veces con una semana de diferencia entre cada prueba.

3.9 Exposición de los machos a aserrín de ratas hembra en estro

Para realizar esta prueba únicamente se escogieron los animales de los grupos lesión falsa, lesión fuera y lesión bilateral del APM.

Al final de todas las pruebas conductuales se colocó a los animales en cajas individuales de acrílico con una cama de aserrín expuesto previamente durante seis horas

con hembras receptivas. Las ratas permanecieron en un cuarto sin ruido ni luz por un lapso de 90 min. antes de que fueran perfundidas.

3.10 Histología

Después de la exposición de los machos a aserrín de ratas hembra en estro, los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital. Los animales fueron perfundidos intracardiamente con solución 0.1 M de salina amortiguadora de fosfatos (PBS) y paraformaldehído al 4% en 0.1 M de solución amortiguadora de fosfatos (PB). Los cerebros fueron congelados y cortados en secciones coronales de 35 μm . Se tomaron dos series de cortes y uno de ellos fue montado en portaobjetos y teñidos con violeta de cresilo para verificar el lugar de las lesiones.

La tinción con violeta de cresilo se realizó de la siguiente forma: inicialmente las laminillas con los cortes del cerebro se desengrasaron con cloroformo y alcohol al 25 %, posteriormente fueron teñidos con violeta de cresilo y fueron pasadas por alcohol al 50 y 70%, y por último fueron pasadas por solución diferenciadora (alcohol al 70% y unas gotas de ácido acético glacial) hasta obtener el contraste deseado; enseguida los cortes fueron deshidratados en alcoholes al 95 y 100% y xileno (alcohol 100% y xileno en proporción 1:1) y finalmente se colaron los cubreobjetos a las laminillas. Una vez procesados los cortes, se observaron a través del microscopio con el fin de verificar la localización y extensión de las lesiones. La presencia de depleción neuronal y gliosis en el APM fue utilizada para determinar la extensión del daño electrolítico en el cerebro de las ratas (Paredes y col., 1993a; Paredes y Baum, 1995).

3.11 Inmunohistoquímica

La segunda serie de tejidos se utilizó para realizar la inmunohistoquímica de acuerdo al siguiente protocolo:

- 1.- Dos lavados en PBS 0.1 M en 10 min.
- 2.- Un lavado con H₂O₂ 1% en PBS 0.1 M durante 30 min.
- 3.- Cuatro lavados en PBS 0.1 M en 60 min.
- 4.- Posteriormente se incubó 16 horas en anticuerpo primario 1:5000 en una solución al 0.52% de Tritón X 100.
- 5.- Cuatro lavados con Tritón X 100 al 0.02% en PBS 0.1 M en una hora.
- 6.- Se incubó en el anticuerpo secundario (IgG anticinejo en cabra bioteniado) por dos horas
- 7.- Cuatro lavados con Tritón X 100 al 0.02% en PBS 0.1 M 4 en una hora.
- 8.- Enseguida se incubó en ABC (elite) por 90 min.
- 9.- Cuatro lavados en PBS en una hora.
- 10.- Por último se realizó la reacción de Nickel DAB por 7 min.
- 11.- Tres lavados en PBS en 30 min.

Al final se montaron las secciones en portaobjetos gelatinizados, se dejaron secar por 3 días a temperatura ambiente. Posteriormente se rociaron los portaobjetos con agua destilada y se dejaron secar un día. Finalmente fueron cubiertos con Permount y se les colocó el cubreobjetos.

3.12 Conteo del Número de Células Inmunoreactivas a Fos

El conteo de las células inmunoreactivas a Fos (IR-Fos), se realizó en estructuras que forman parte del sistema vomeronasal como el bulbo olfatorio accesorio, en la capa mitral y granular de éste y en la amígdala medial en su parte anterior y posterior, con la ayuda de

un microscopio Olympus, en un aumento de 400X. El área donde se contó fue de aproximadamente 0.442 mm². Las células con Fos fueron marcadas para cada región cerebral de interés sobre una hoja de papel usando el microscopio de luz con una cama translúcida.

Se contó en tres cortes distintos, pero adyacentes, de cada región, para cada sujeto.

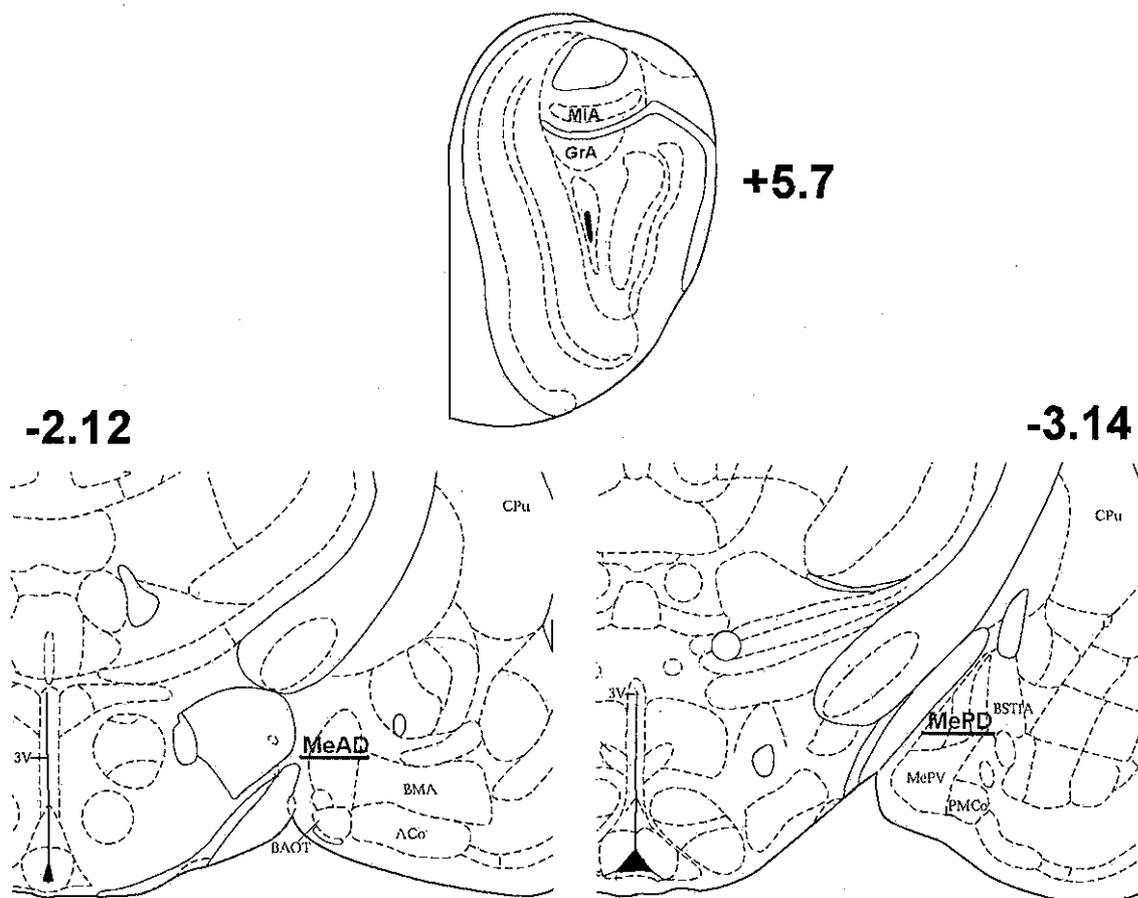


Fig. 8 Representación esquemática de el lugar en donde se llevo a cabo el conteo de IR-Fos. Los números indican la posición del corte coronal con respecto a bregma. Capa mitral del bulbo olfatorio accesorio (MiA), capa granular del bulbo olfatorio accesorio (GrA), núcleo antero-dorsal de la amígdala media (MeAD), núcleo postero-dorsal de la amígdala media (MePD), tercer ventrículo (3V).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.13 Análisis Estadístico

Los datos de los porcentajes de sujetos que montaron, intromitieron y eyacularon en cada grupo se analizaron usando la prueba de χ^2 , posteriormente se utilizó la probabilidad exacta de Fisher para encontrar diferencias entre grupos (dos por dos). Para analizar los datos antes y después de la lesión, se utilizó una prueba de los signos.

Para las latencias de monta, intromisión y eyaculación se utilizaron pruebas de Kruskal-Wallis seguidas de una prueba post hoc (Mann-Whitney) para detectar diferencias entre grupos. Para antes y después de la lesión se utilizó una ANOVA de Friedman con una prueba de rangos asignados de Wilcoxon como prueba post-hoc.

Para el número de células inmunoreactivas a Fos, se utilizó una ANOVA de 3 X 2 factores (tipo de lesión, condición olfatoria), para cada estructura analizada, con una prueba de Fisher como post-hoc.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 Histología

Al momento de perfundir a los animales para realizar la histología habían sobrevivido 37 animales lesionados y 10 animales con lesión falsa.

En los animales expuestos a la lesión bilateral electrolítica del APM/HA, el análisis histológico reveló la existencia de 14 machos en los que la lesión se encontró fuera del área preóptica media del hipotálamo anterior (APM/HA) (Fig. 6). Se observaron también 8 machos con lesión parcial del APM/HA (este grupo incluye animales con lesión unilateral o bilateral pero que no abarca en su totalidad el APM/HA) (Fig. 6); así como también 15 sujetos en los cuales la lesión destruyó bilateralmente el APM/HA (Fig. 6). Así después del análisis histológico se conformaron 4 grupos (incluido el grupo con lesión falsa). Basándose en estos grupos se realizaron los análisis estadísticos.

- | | | |
|--|----------------|--------|
| • Machos con lesión falsa del APM/HA | (FALSA ó SHAM) | (n=10) |
| • Machos con lesión fuera del APM/HA | (FUERA) | (n=14) |
| • Machos con lesión parcial del APM/HA | (PARCIAL) | (n=8) |
| • Machos con lesión bilateral del APM/HA | (BILATERAL) | (n=15) |

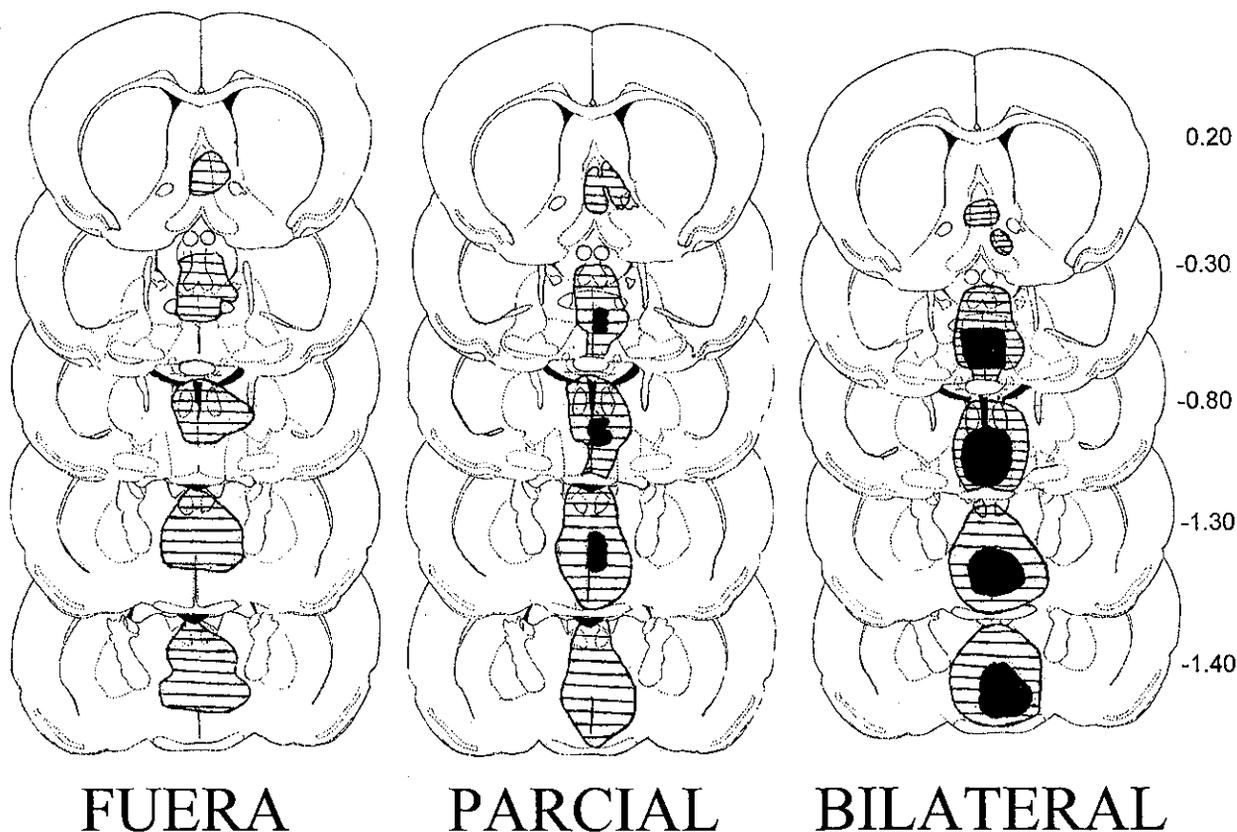


Fig. 9 Composición de la extensión de la lesión en los 3 grupos obtenidos después de la histología. La región clara marca la máxima extensión de daño en algún miembro del grupo. La región obscura es donde coincide el daño de todos los miembros del grupo. Los números a la derecha muestra la distancia antero-posterior basándose en bregma (Láminas modificadas de Paxinos y Watson, 1986).

4.2 Conducta Sexual

En los resultados se observó que en el grupo de lesión Falsa y Fuera del APM, no cambió significativamente el porcentaje de animales que montaron (Fig. 10), intrometen (Fig. 11) y eyaculan (Fig. 12) después de la lesión. Con respecto a la latencia de monta (Fig. 13), de intromisión (Fig. 14), de eyaculación (Fig. 15) y el número de montas (Fig. 16) e intromisiones (Fig. 17) no se observaron diferencias conductuales significativas después

de la lesión. En todos estos parámetros conductuales el grupo lesión Fuera, no mostró déficit en la conducta sexual después de la lesión.

Lo mismo pasó con el grupo Parcial en el porcentaje del patrón de monta (Fig. 10), intromisión (Fig. 11) y eyaculación (Fig. 12), así como en las latencias de los patrones registrados, con excepción de la latencia de eyaculación la cuál difirió del grupo Fuera en las semanas 4 y 5 que corresponden a las dos semanas después de la lesión. Este grupo también mostró diferencias significativas con respecto al grupo Fuera en el número de montas en la semana 5, que corresponde a la segunda semana posterior a la lesión. En resumen, este grupo no mostró alteraciones significativas en su conducta sexual después de la lesión.

Por el contrario el grupo con lesión bilateral mostró una deficiencia significativa en los diferentes patrones de conducta sexual, en las tres semanas posteriores a la lesión electrolítica. Al analizar los resultados de los porcentajes de ratas que montaron (Fig. 10), intromitieron (Fig. 11), y eyacularon (Fig. 12) durante las diferentes semanas de observación, se encontró una reducción significativa en el grupo de ratas Bilateral a diferencia de los grupos con lesión Falsa, Fuera y Parcial, cuyos porcentajes no se vieron alterados significativamente. Por otro lado, se observó un aumento significativo en los parámetros conductuales de latencia de monta (Fig. 13), latencia de intromisión (Fig. 14) y latencia de eyaculación (Fig. 15), en el grupo Bilateral después de la lesión electrolítica. No así en los grupos con lesión Falsa, Fuera y Parcial. Respecto al número de montas (Fig. 16) e intromisiones (Fig. 17), se observa como en el grupo Bilateral, el número de ratas que monta e intromete disminuye significativamente a través de las distintas semanas de observación después de la lesión.

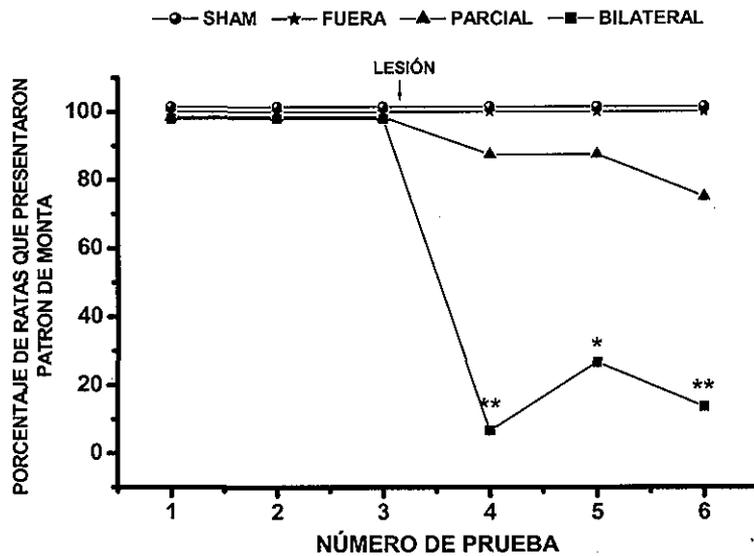


Fig 10 Porcentaje de ratas que presentaron el patrón de monta, antes y después de la lesión del APM/HA en los diferentes grupos. * Diferente de lesión Falsa, Fuera y parcial $p < 0.05$ ** Diferente de lesión Falsa y Fuera $p < 0.05$

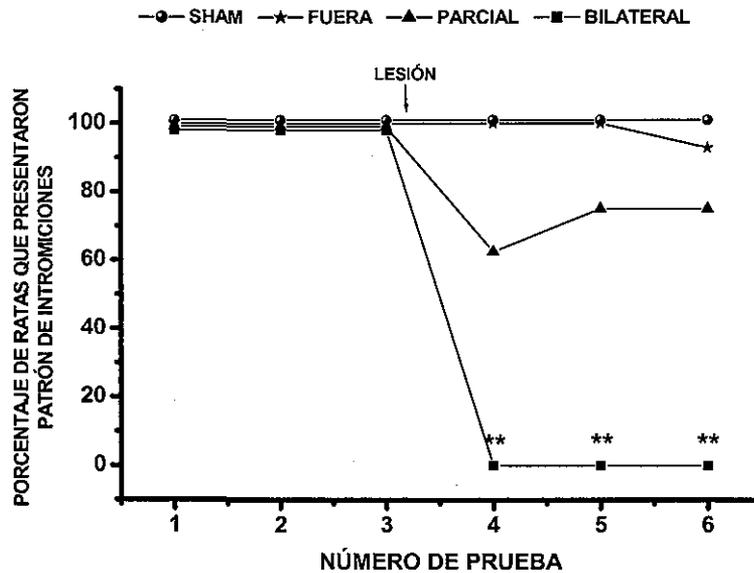


Fig. 11 Porcentaje de ratas que presentaron el patrón de intromisión, antes y después de la lesión del APM/HA en los diferentes grupos. ** Diferente de lesión Falsa, Fuera y Parcial $p < 0.01$

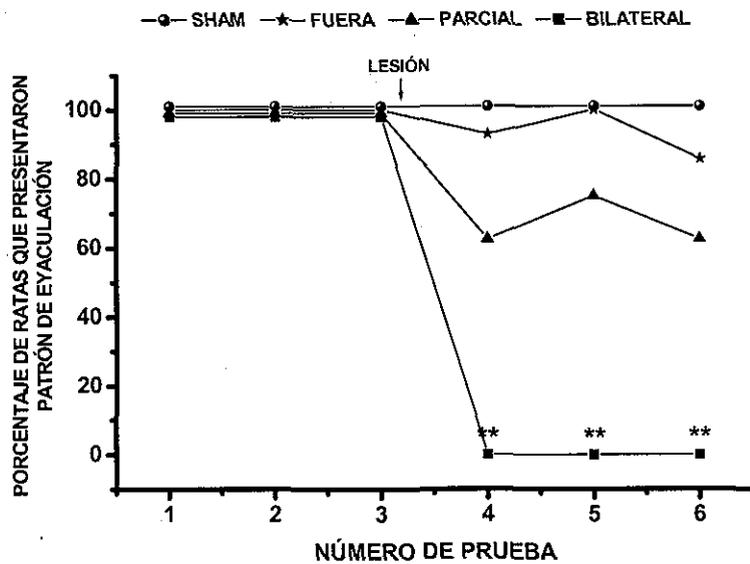


Fig. 12 Porcentaje de ratas que presentaron el patrón de eyaculación, antes y después de la lesión del APM/HA en los diferentes grupos.
****** Diferente de lesión Falsa, Fuera y Parcial $p < 0.01$

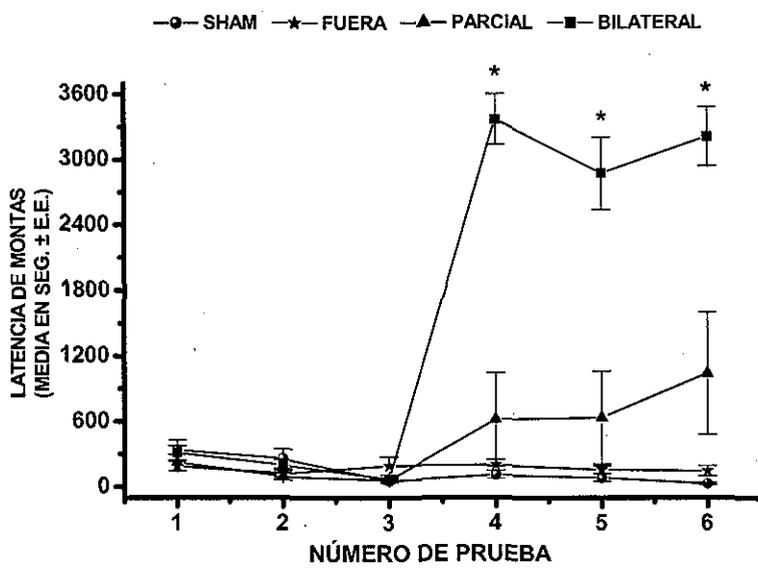


Fig 13 Latencia de monta en los sujetos que presentaron el patrón, antes y después de la lesión del APM/HA en los diferentes grupos.
***** Diferente de lesión Falsa, Fuera y Parcial $p < 0.05$

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

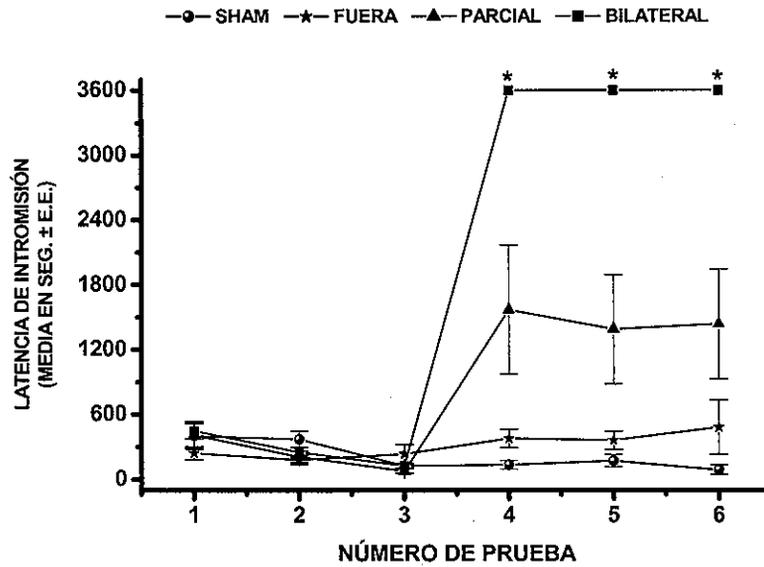


Fig 14 Latencia de intromisión en los sujetos que presentaron el patrón, antes y después de la lesión del APM/HA en los diferentes grupos.
 * Diferente de lesión Falsa, Fuera y Parcial $p < 0.05$

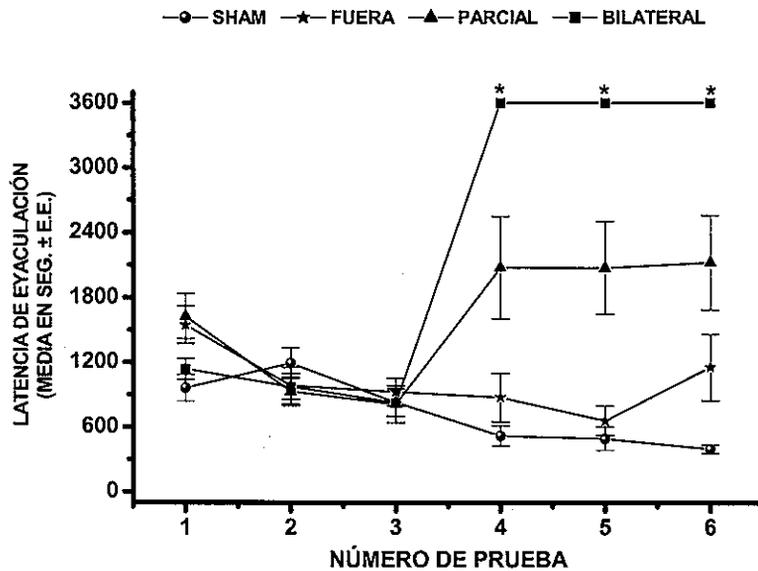


Fig. 15 Latencia de eyaculación en los sujetos que presentaron el patrón, antes y después de la lesión del APM/HA en los diferentes grupos.
 * Diferente de lesión Falsa, Fuera y Parcial $p < 0.05$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

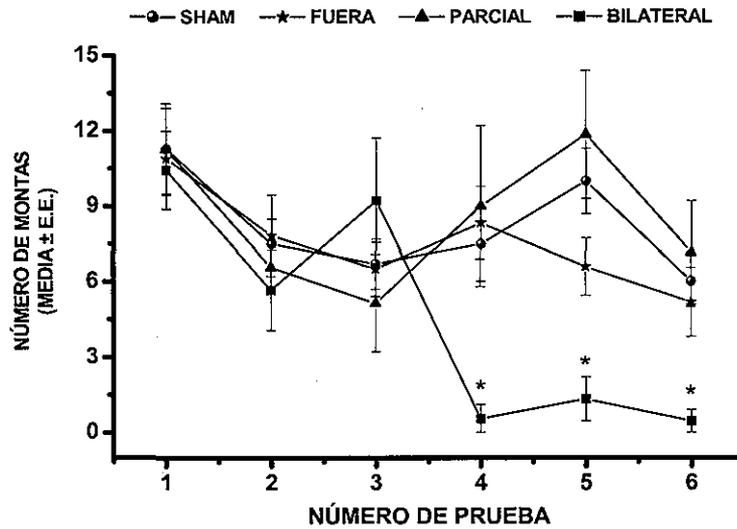


Fig. 16 Número de montajes en los sujetos que presentaron el patrón, antes y después de la lesión del APM/HA en los diferentes grupos.
 * Diferente de lesión Falsa, Fuera y Parcial $p < 0.05$

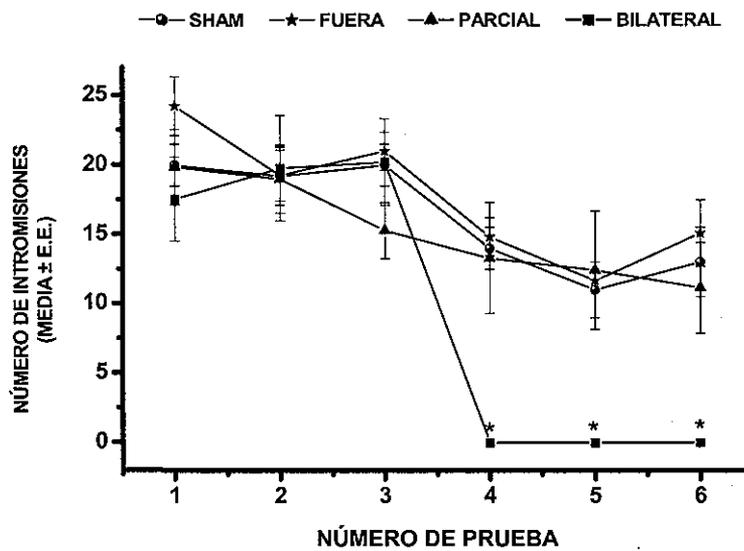


Fig 17 Número de intrusiones en los sujetos que presentaron el patrón, antes y después de la lesión del APM/HA en los diferentes grupos.
 * Diferente de Fuera y Parcial $p < 0.05$

4.3 Coordinación Motora

Las pruebas de coordinación motora no mostraron diferencias entre los 4 grupos de ratas (Lesión Falsa, Fuera, Parcial y Bilateral), en ninguno de los tres parámetros utilizados: el número de caídas en 3 minutos de prueba, el tiempo de caída en la prueba y la velocidad a la que se cayeron los animales del rodillo.

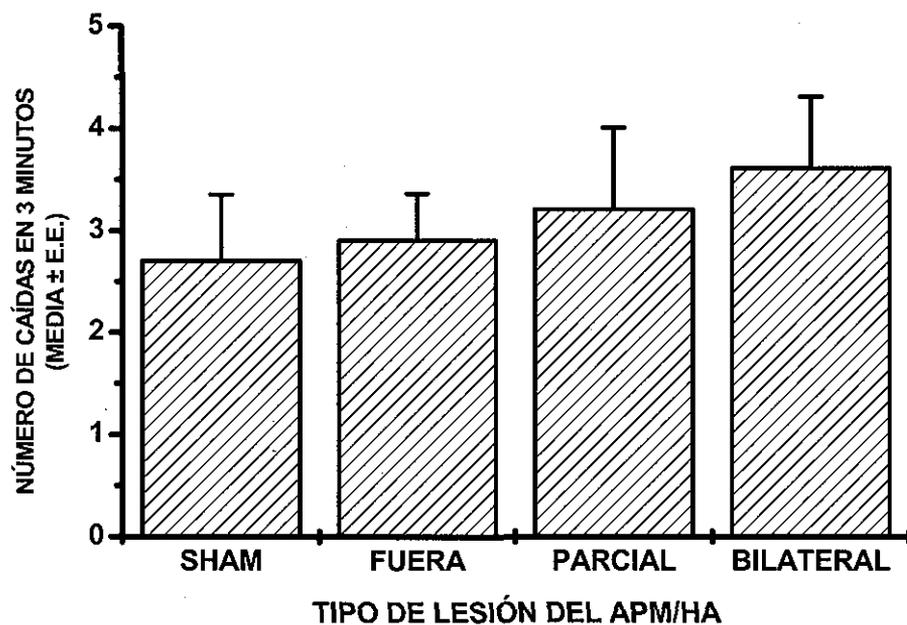


Fig. 18 Número de caídas en 3 min., en los cuatro grupos de ratas

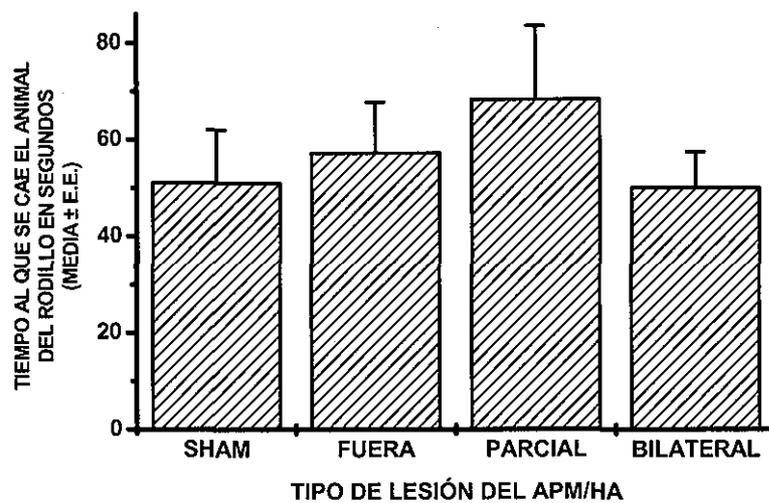


Fig. 19 Tiempo en que termina la prueba (momento en el cual el animal cae del rodillo).

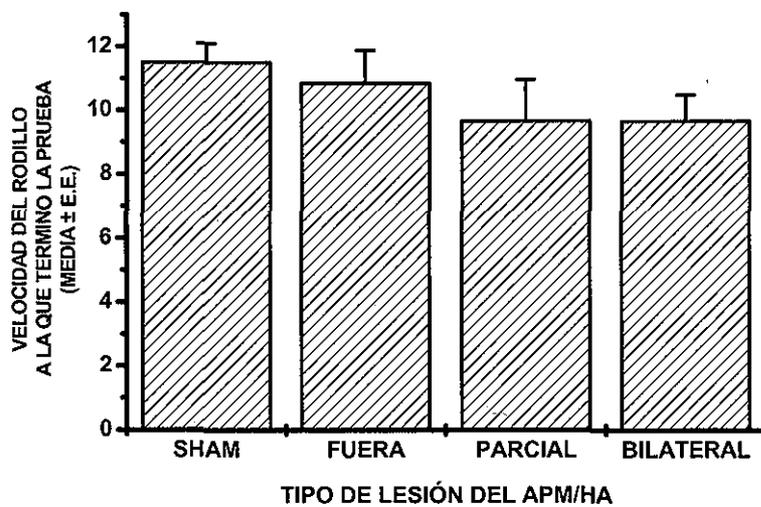


Fig. 20 Velocidad del rodillo al momento de terminar la prueba

4.4 Pruebas Motivacionales

El análisis de la conducta sexual en las pruebas motivacionales no mostró una recuperación de la conducta en las ratas con lesiones bilaterales del APM/HA. El porcentaje de los patrones conductuales de estas tres pruebas motivacionales, fué similar a los encontrados en las tres pruebas conductuales post-lesión.

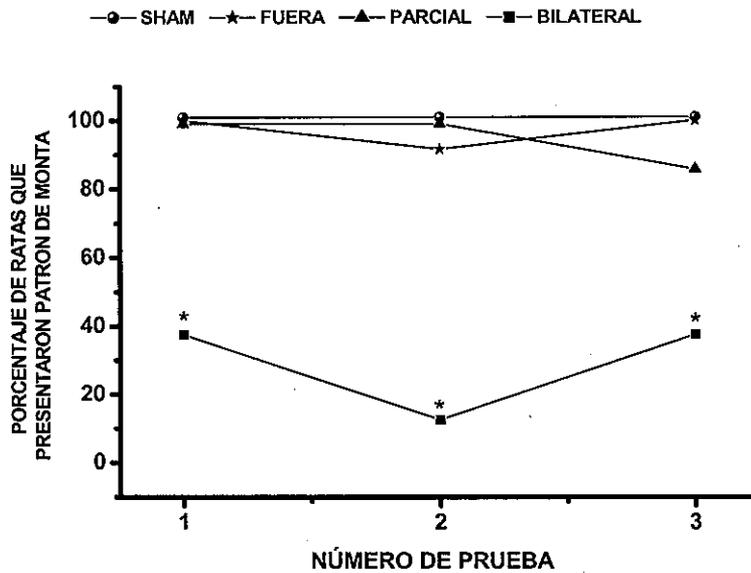


Fig. 21 Porcentaje de ratas que presentaron el patrón de monta, durante las 3 pruebas motivacionales * Diferente de falsa, fuera y parcial $p < 0.05$

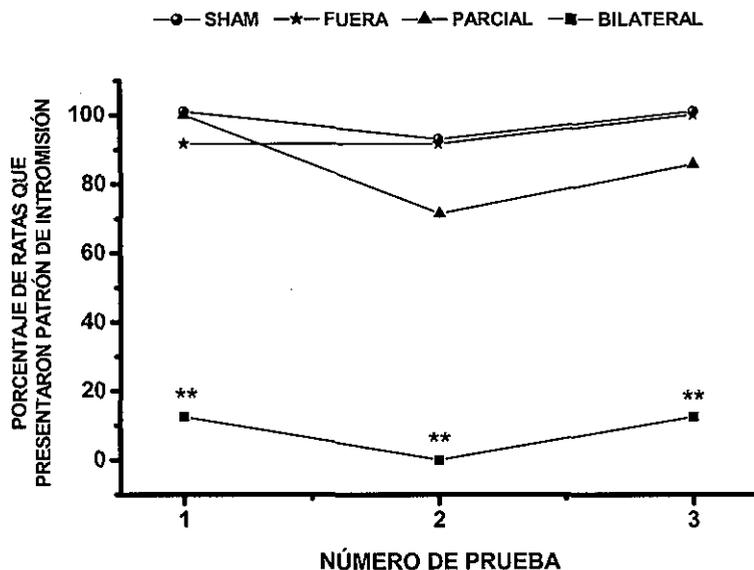


Fig. 22 Porcentaje de ratas que presentaron el patrón de intromisión, durante las 3 pruebas motivacionales ** Diferente de falsa, fuera y parcial $p < 0.05$

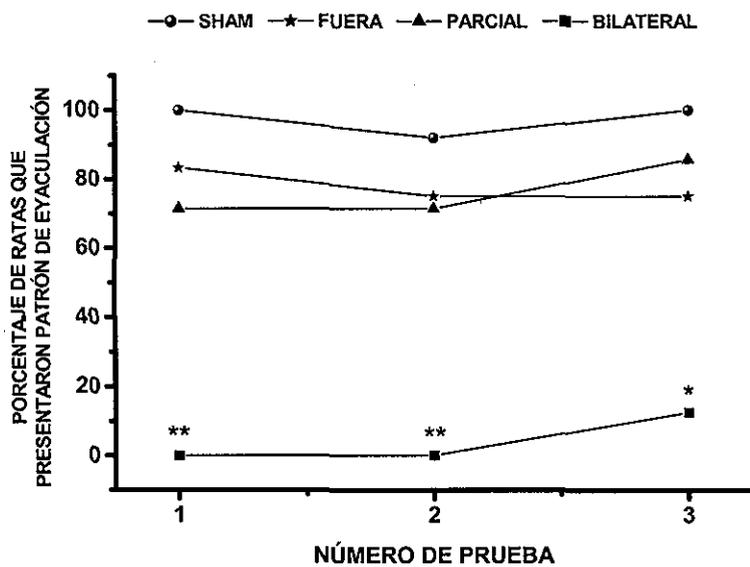


Fig. 23 Porcentaje de ratas que presentaron el patrón de eyaculación, durante las 3 pruebas motivacionales ** Diferente de falsa, fuera y parcial $p < 0.05$

4.5 INMUNOHISTOQUÍMICA CONTRA FOS

Los resultados muestran una diferencia de el número de células inmunoreactivas a Fos en la condición de estro en comparación con la condición limpio. Esto es constante para todas las estructuras estudiadas del sistema vomeronasal así como para los tres grupos estudiados (lesiones Falsa, Fuera y Bilateral), excepto en el grupo Bilateral en la capa mitral del Bulbo Olfatorio accesorio, en donde no se observan diferencias entre las condiciones de estro y limpio.

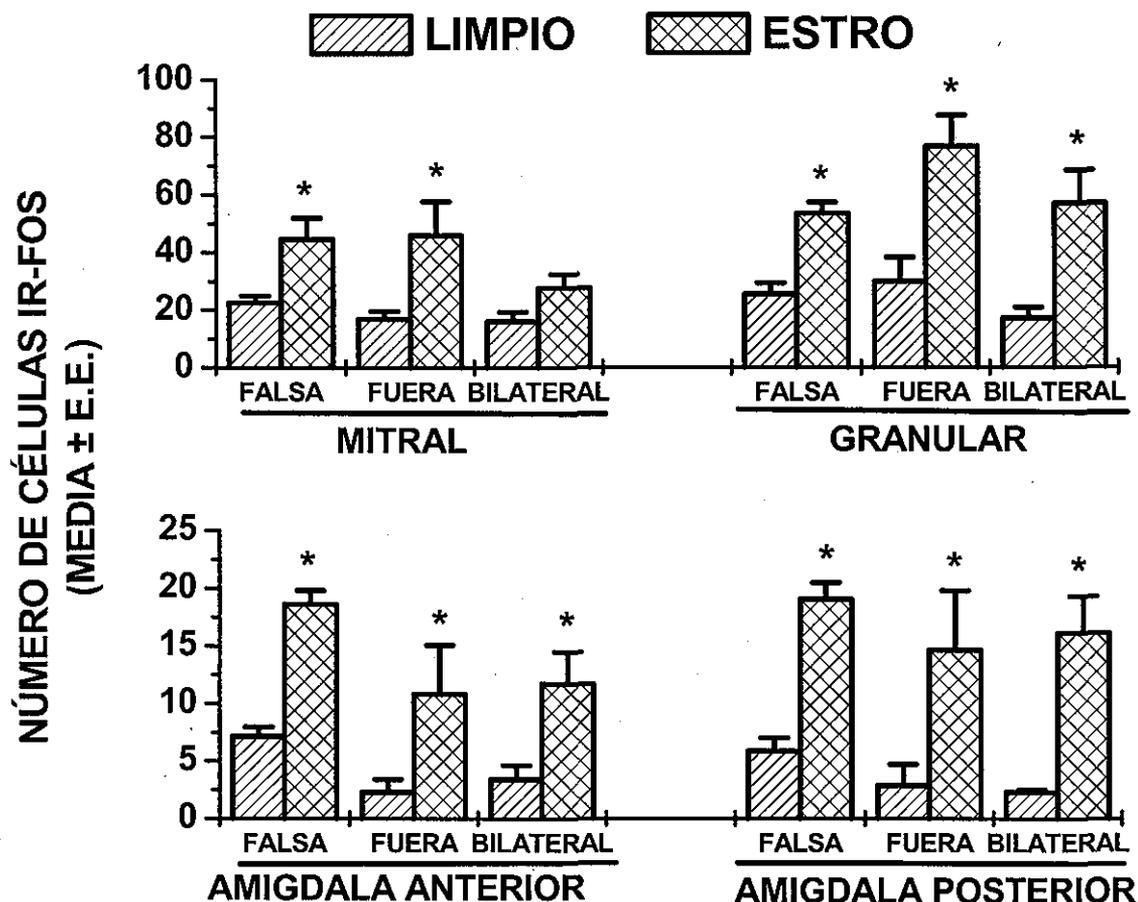


Fig. 24 Número de células immuno-reactivas a la proteína Fos en los tres grupos de animales * Diferente de limpio, mismo grupo $p < 0.05$

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

5.1 Discusión

Como hemos descrito anteriormente, lesiones de diferentes regiones del cerebro pueden alterar en diverso grado la conducta sexual masculina. Sin embargo los efectos más claros se observan cuando se lesiona el APM/HA (Brookhart y Dey, 1941; Hillarp y Col., 1954; Paredes y Col., 1990; 1993). Cuando las lesiones en esta estructura son grandes, la conducta sexual se elimina por completo (Paredes y Col., 1998). Pero además es necesario que las lesiones sean bilaterales, ya que las lesiones unilaterales solo producen alteraciones transitorias en la conducta sexual (Lisk, 1968).

En el presente trabajo, se reduce el número de animales que presentan patrones de monta, y se elimina en el caso de los patrones de intromisión y eyaculación, al lesionar bilateralmente el APM/HA. Nuestros datos también demuestran que la especificidad de la lesión es importante para observar pérdida de la conducta sexual masculina, ya que no se observaron diferencias significativas entre el grupo LP (que tenía lesiones unilaterales y parciales del APM/HA), y el grupo LF (que tenía lesiones fuera del APM/HA).

Como también hemos descrito anteriormente (Capítulo 1), se han planteado diferentes hipótesis para tratar de explicar los mecanismos a través de los cuales las lesiones del APM/HA afectan la conducta sexual.

Una de estas hipótesis postula que neuronas de esta región están involucradas en aspectos ejecutorios de la conducta sexual masculina, que incluyen las respuestas motoras de monta, intromisión y eyaculación y no en aspectos motivacionales de la copula, como podrían ser acercarse y perseguir a una hembra receptiva. Esta hipótesis se basa en los estudios de Everitt y Stacey (1987), donde demostraron que ratas macho que aprendieron a apretar una palanca en una caja de Skinner para obtener la presencia de una hembra receptiva y copular con ella, continúan apretando la palanca después de lesiones

bilaterales del APM/HA. Una vez en presencia de la hembra no despliegan la conducta sexual, sugiriendo que las lesiones del APM/HA alteran la ejecución de la conducta y no su aspecto motivacional.

Paredes y Agmo en 1989, demostraron que la administración intra-peritoneal de baclofen (un agonista gabaérgico), en diferentes concentraciones, afecta gradualmente la coordinación motora, afectando también en forma directamente proporcional la ejecución de la conducta sexual. En el presente trabajo evaluamos la coordinación motora de los animales lesionados bilateralmente del área preóptica media. Existía la posibilidad de que la lesión del APM/HA afectara la coordinación motora de la rata, y ésta a su vez, estuviera afectando la ejecución de su conducta sexual. De esta forma en el presente trabajo quedó demostrado que las lesiones del APM, no afectan la coordinación motora fina de las ratas lesionadas, y que esto estuviese interfiriendo con el despliegue de los patrones conductuales como la monta y la intromisión en la conducta sexual.

Investigaciones previas han mostrado que la ejecución sexual en varias especies de vertebrados es aumentada por el simple hecho de ver la actividad copulatoria de otros machos, antes de ser colocados con una hembra receptiva. Esto a podido ser demostrado en toros, cabras, caballos y cerdos (Kerruish, 1955; Pickett y col., 1977; Hemsworth y Galloway, 1979; Blockey, 1981; Mader y Price, 1984; Price y col., 1984). Sin embargo también se a mostrado, que esta exposición, no tiene ningún efecto en borregos (Price y col., 1998). En ratas Hard y Larsson en 1969, demostraron que la exposición previa al coito de ratas macho a animales copulando aumenta su posterior ejecución sexual. Otro aspecto analizado en este trabajo fue determinar si tratamientos conductuales, que producen un aumento en la motivación de los machos de diferentes especies, produciría una recuperación de la conducta sexual en aquellos machos que perdieran esta conducta por la lesión bilateral del APM. Los resultados demuestran que esto no fue posible, ya que los machos que perdieron la conducta sexual por la lesión bilateral del APM, no recuperaron la conducta después de tres pruebas de conducta sexual con estimulación que fueron realizadas. Esto es consistente con reportes previos en los que diferentes

tratamientos, que estimulan la cópula en machos intactos, no logran la recuperación de la conducta sexual masculina después de lesiones del APM, como es el caso de manipulación del sujeto, reemplazamiento en varias ocasiones de la rata hembra estímulo, durante la prueba conductual (para una revisión ver Meisel y Sach, 1994) ó choques eléctricos en los flancos de la rata macho (Meisel, 1983). Sin embargo, cabe mencionar que en el caso del presente trabajo la estimulación se realizó de forma diferente, ya que se mantuvo al macho estímulo todo el tiempo, mientras el sujeto copulaba. También es importante mencionar que a pesar de que el macho estímulo permaneció en toda la prueba, esto no impidió que el sujeto experimental ejecutara la conducta sexual, e incluso eyaculara en los grupos con lesión falsa, fuera y parcial.

La recuperación de la conducta sexual en los machos lesionados en el APM sólo se ha observado usando dos estrategias. Hansen (1982) inyectó intraperitonealmente lisuride (agonista del receptor de catecolaminas). Con este tratamiento el 100% de los animales reanudaron su conducta sexual y el 50% eyaculó. Cuando estos mismos animales fueron tratados con solución salina, los animales no fueron capaces de copular. Es interesante mencionar que Hansen administró el lisuride diez días después de la lesión, mientras que en otros trabajos (Paredes y col., 1993), en los cuales los animales, fueron tratados con lisuride 15 semanas posteriores a la lesión, dichos animales no recuperaron la conducta sexual masculina. Lo anterior demuestra que los efectos del lisuride dependen del tiempo de su administración después de la lesión.

Para que la conducta sexual pueda llevarse a cabo es necesario que los machos sean capaces de detectar a las hembras sexualmente receptivas. Los roedores utilizan para este fin principalmente el sentido del olfato. Estudios en hurones (Paredes y Baum, 1995; Kindon y col., 1996) y en ratas (Paredes y col., 1998) demuestran que las lesiones en el APM/HA de machos, elimina su conducta sexual por completo y aumentan su preferencia por un macho activo, sugiriendo que neuronas de esta región son importantes en el procesamiento de las claves quimiosensoriales que permiten la interacción y preferencia por una pareja heterosexual. Estos trabajos también sugieren que la lesión del APM/HA

produce una alteración motivacional en la rata macho, la cual ocasiona que el macho no este motivado para la búsqueda de la hembra receptiva y por lo tanto de la cópula. En un trabajo previo, nuestro grupo de trabajo (Hurtazo, 2000), demostró que las ratas macho con lesiones en el APM no pueden diferenciar entre el olor de una hembra receptiva de una no receptiva, por esta razón propusimos la evaluación de la activación del sistema vomeronasal por medio de la proteína Fos, para poder discernir, si la lesión del APM afectaba el procesamiento de las señales olfatorias sexualmente relevantes en el sistema vomeronasal.

Se ha utilizado la detección de la proteína Fos como una técnica para medir la respuesta de los circuitos neuronales involucrados en el control de la conducta sexual, sobre todo la respuesta del circuito de proyección vomeronasal, a varios tipos de estímulos sexualmente relevantes en la rata, tanto en machos como en hembras (Paredes y cols., 1998). Se debe mencionar que la disrupción quirúrgica de la aferencia vomeronasal que llega al cerebro, atenúa parcialmente el aumento de c-fos inducido por la cópula en diferentes partes del circuito de proyección vomeronasal (Dudley y cols., 1992; Fernandez-Fewell y cols. ,1994).

Las conexiones recurrentes son otro elemento crítico en el circuito vomeronasal involucrado en la conducta sexual. Un modelo lineal del procesamiento de la información, con conexiones unidireccionales es un sistema reactivo solamente. Sin embargo estudios conductuales han mostrado que la cópula no es una respuesta conductual fija a señales sensoriales sexualmente relevantes, si no que es modificada por una expresión temprana de la conducta sexual (para una revisión ver Baum, 1992). Así en machos sexualmente expertos, la latencia de copulación es menor (Vega Matuszczyk y Larsson, 1993) y la duración de la cópula post-castración es prolongada (Bunell y Kimmel, 1965). Estas observaciones conductuales implican la existencia de un sistema de retroalimentación en el circuito de la conducta sexual. En nuestros resultados la lesión del APM no daña en forma significativa la activación de la proteína Fos en estructuras profundas del Sistema Vomeronasal, lo que nos dice que esta estructura no afecta la forma como el Sistema Vomeronasal esta procesando la información olfatoria sexualmente relevante, en

estructuras como la amígdala medial anterior y posterior. Esto concuerda con trabajos previos (Baum y Everitt, 1992), donde lesiones unilaterales del APM/HA, no afectan la expresión de Fos en la amígdala medial. Sin embargo se observa que en el caso de la capa mitral no se encuentran diferencias entre la condición estro y limpio en el grupo de animales con la lesión bilateral del APM. En un trabajo previo de Bressler y Baum en 1996, ovariectomizaron machos y hembras que posteriormente tratan con Propionato de Testosterona, estos animales fueron divididos en 3 grupos, los cuales fueron expuestos a 3 condiciones diferentes: olor de una cama de hembras en estro, olor de una cama de hembras en anestro y olor de una cama de aserrín limpio. En este trabajo observan que la capa mitral del bulbo olfatorio accesorio de las ratas macho que fueron expuestas a la cama de hembras en anestro, no tiene diferencias en el número de células inmunoreactivas a Fos, comparándolo con la cama de aserrín limpio. En un trabajo posterior Paredes y cols, en 1998 donde ratas ovariectomizadas tanto machos como hembras, tratadas con Propionato de testosterona o vehículo (aceite), encuentran un número similar de neuronas que responden a la proteína Fos en el Sistema Vomeronasal tanto en machos como en hembras tratadas con PT, solo que en las hembras no se observan diferencias en la capa mitral del BOA, comparando la condición de cama de hembras en estro contra la cama limpia.

En base a los trabajos anteriormente mencionados se observa que el patrón de inmunoreactividad a Fos en el sistema vomeronasal de los sujetos lesionados del APM/HA y expuestos al olor de hembras receptoras es similar a aquellos machos que se han expuesto al olor de hembras no receptoras (Bressler y Baum, 1996), ó a ratas hembra tratadas con Propionato de Testosterona y expuestas a olor de hembras receptoras (Paredes y cols., 1998).

Sin embargo cabe mencionar que en estos dos trabajos no se da una probable explicación sobre el porque no se encuentran diferencias en la capa mitral comparando el aserrín proveniente de hembras y el aserrín limpio. Así al revisar la literatura sobre el patrón de actividad neuronal detectado por la proteína Fos da la impresión que no se han valorado los resultados obtenidos en la capa mitral del bulbo olfatorio accesorio. La

importancia de la capa mitral del BOA en la detección de estímulos sexualmente relevantes de una hembra en estro ha sido también demostrado en ratón. Matsuoka y cols., en 1999, demostraron que la capa mitral y granular del BOA expreso significativamente más neuronas IR-Fos con el olor proveniente de una cama de hembras en comparación con la cama limpia.

Las dendritas de las células mitrales y granulares forman sinapsis dendrodendríticas, que consisten en un par de sinapsis excitatorias e inhibitorias (Paxinos, 1998), Cuando las dendritas de las células mitrales son activadas por la aferencia del nervio vomeronasal, estas despolarizan las dendritas de las células granulares por medio de la liberación de glutamato (Kaba y Keverne, 1992). La despolarización de las células granulares, tiene como consecuencia la liberación de GABA, lo que provoca una hiperpolarización de las dendritas de las células mitrales. Este sistema de retroalimentación, probablemente tiene un importante papel regulador en el control de la salida de la información del BOA hacia regiones mas profundas del sistema vomeronasal.

Por el momento es importante señalar que el patrón de inmunoreactividad a Fos, en el bulbo olfatorio accesorio (capa mitral) de los sujetos lesionados bilateralmente del APM/HA es similar al patrón de inmunoreactividad en machos expuestos a una cama de aserrín expuesta a hembras en anestro (Bressler y Baum, 1996). Como ya se mencionó, en un trabajo previo en nuestro laboratorio (Hurtazo, 2000), se ha demostrado que las lesiones del APM/HA ocasiona una pérdida en la preferencia al olor proveniente de una hembra receptiva.

Sin embargo en este momento no tenemos una explicación satisfactoria de que vía eferente del APM/HA hacia el BOA, fue afectada para dar los resultados que fueron observados por las lesiones de esta estructura. Para solucionar este problema se podrían realizar marcaje con trazadores anterógrados inyectados en el APM, o estudios de registros electroencefalográficos en el BOA ante estímulos sexuales de la rata hembra, en condición normal e inactivación del APM.

La importancia del estudio radica en que es la primera vez que se estudia la actividad del sistema vomeronasal por Fos, en ratas con lesiones del APM/HA, que producen un déficit en la preferencia sexual, y olfatoria por una hembra receptiva.

5.2 CONCLUSIONES

- Solo lesiones bilaterales y suficientemente amplias del APM/HA producen una pérdida total de la conducta sexual masculina en la rata macho.
- Estas lesiones bilaterales o parciales, no producen una alteración importante de la coordinación motora de la rata macho que pudiera interferir con la ejecución normal de la conducta sexual masculina.
- Las ratas que perdieron la conducta sexual por las lesiones bilaterales no recuperan la conducta sexual después de las pruebas de estimulación sexual.
- En el caso de Fos no se encontró afectada la actividad neuronal de las ratas lesionadas en comparación de las ratas con lesión falsa ó fuera en partes superiores del sistema vomeronasal, como es la amígdala medial.
- En el caso de la capa mitran en la cual no se encontraron diferencias entre la condición estro y limpio, en el grupo con lesión bilateral, se propone que no se ha valorado adecuadamente el papel de esta capa del BOA y su importancia en el procesamiento de las señales olfatorias sexualmente relevantes.

REFERENCIAS

Alcock KJ. (1979). Animal behavior. An evolutionary approach. Sinauer Associates. Inc. Sunderland, Mass. pp. 1-38.

Bakker J, van Ophemert J, Timmerman MA, de Jong FH, Slob AK. (1995). Endogenous reproductive hormones and nocturnal rhythms in partner preference and sexual behavior of ATD-treated male rats. Neuroendocrinology. 62: 396-405.

Barfield RJ & Sachs BD. (1968). Sexual behavior: stimulation by painful electrical shock to skin in male rats. Science. 161: 392-395.

Barfield RJ, Wilson C & McDonald PG. (1975). Sexual behavior: extreme reduction of postejaculatory refractory period by midbrain lesions in male rats. Physiol. Depart. Royal Veterinay College. 189: 147-149.

Baum MJ & Everitt BJ. (1992). Increased expression of c-fos in the medial preoptic area after mating in male rats: role of afferent inputs from the medial amygdala and midbrain central tegmental field. Neurosciences. 50: 175-190.

Beach FA & Holtz-Tucker AM. (1959). Effects of different concentrations of androgen upon sexual behavior in castrated male rats. Journal of Comparative Physiology and Psychology. 42: 433-453.

Bellringer JF, Pratt HPM, Keverne EB. (1980) Involvement of the vomeronasal organ and prolactin in pheromonal induction of delayed implantation in mice. Journal of Reproductive Fertil. 59: 223-228.

Bermant G. (1965). Rat sexual behavior: photographic analysis of the intromission response. Psychon Sci. 2: 65-66.

Beyer C, Morali G, Naftoli F, Larsson & Perez-Palacios G. (1976). Effect of some antiestrogens and aromatase inhibitors on androgen induced sexual behavior in castrated male rats. Hormones and Behavior. 7: 353-363.

Blokey MA de B. (1981). Modification of a serving capacity test for beef bulls. Appl. Anim. Ethol. 7: 321-336.

Brackett NL & Edwards DA. (1984). Medial preoptic connections with the midbrain tegmentum are essential for male sexual behavior. Physiology and Behavior. 32: 79-84.

- Bressler SC and Baum MJ. (1996). Sex comparison of neuronal FOS immunoreactivity in the rat vomeronasal projection circuit after chemosensory stimulation. Neuroscience. 71: 1063-1072.
- Brookhart Dey. (1941). Reduction of sexual behavior in the male guinea-pigs by hypothalamic lesions. American Journal Physiology. 133: 551-554.
- Campeau S & Watson SJ. (1997). Neuroendocrine and behavioural responses and brain pattern of c-fos induction associated with audiogenic stress. Journal of Neuroendocrinology. 9: 577-588.
- Chan RKW, Brown ER, Ericsson A, Kovács KL, Sawchenko PE. 1993. A comparison of two immediate-early genes, c-fos and NGF1-B, as markers for functional activation in stress-related neuroendocrine circuitry. Journal of Neuroscience. 13: 5126-5138.
- Cohen D & Curran T. 1988. Fra-1: a serum-inducible, cellular immediate-early gene that encodes a Fos-related antigen. Molecular Cell Biology. 8: 2063-2069.
- Commins D. & Yahr P. (1984). Lesions of the sexually dimorphic area disrupt mating and marking in male gerbils. Brain Research Bulletin. 13: 185-193.
- Conrad LCA & Pfaff DW. (1976). Efferents from medial basal forebrain and hypothalamus in the rat. I. An autoradiographic study of the medial preoptic area. Journal of Comparative Neurology. 169: 185-220.
- Cullinan WE, Herman JP, Battaglia DF, Akil H, Watson SJ. 1995. Pattern and time course of immediate-early gene expression in rat brain following acute stress. Neuroscience. 64: 477-505.
- Curran T & Morgan JJ. (1995). Fos: an immediate-early transcription factor in neurons. Journal of Neurobiology. 26: 403-412.
- Curran T & Teich NM. (1982). Candidate product of the FBJ murine osteosarcoma virus oncogene: characterization of a 55,000-Dalton phosphoprotein. Journal of Virology. 42: 114-122.
- Davidson JM. (1966a). Characteristics of sex behavior in male rats following castration. Animal Behavior. 14: 266-272.
- Davidson JM (1966b). Activation of the male sexual behavior by intracerebral implantation of androgen. Endocrinology. 79: 783-794.

Davidson JM. (1980). The psychobiology of sexual experience. In: Davidson J.M. y Davidson R.J. (Ed.) The psychobiology of consciousness. Plenum Press, New York. pp. 271-332.

De Olmos JS, Hardy H, & Heimer L. (1978). The afferent connections of the main and accessory olfactory bulb formations in the rat: An experimental HRP-study. Journal of Comparative Neurology. 181: 213-224.

Deswurry DA, Goodman ED, Sallis PJ & Bunnell B.N. (1968). Effects of hippocampal lesions on the copulatory behavior of the male rats. Physiology and Behavior. 25: 29-55.

Ding JM, Carver WC, Terracio L, Buggy J. (1994). Proto-oncogene c-fos and the regulation of vasopressin gene expression during dehydration. Molecular Brain Research. 21: 247-255.

Dragunow M & Faull RL. (1989). The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway. J. Neurosci. Methods. 29: 261-265.

Dudley CA, Rajendren G & Moss RL. (1992). Induction of fos immunoreactivity in central accessory olfactory structures of the female rat following exposure to conspecific males. Moll. Cell. Neurosci. 3: 360-369.

Duncan GE, Johnson KB, Breese GR. (1993). Topographic patterns of brain activity in response to swim stress: assessment by 2-deoxyglucose and expression of Fos-like immunoreactivity. Journal of Neuroscience. 13: 3932-3943.

Edwards DA & Einhorn LC. (1986). Preoptic and midbrain control of sexual motivation. Physiology and Behavior. 37: 329-335.

Emery DE & Sachs BD. (1976). Copulatory behavior in male rats with lesions in the bed nucleus of the stria terminalis. Physiology and Behavior. 17: 803-806.

Fenelon VS, Poulain DA & Theodosis DT. (1993). Oxytocin neuron activation and Fos expression: a quantitative immunocytochemical analysis of the effect of lactation, parturition, osmotic and cardiovascular stimulation. Neuroscience. 53: 77-89.

Fernandez-Fewell GD & Meredith M. (1994). C-fos expression in vomeronasal pathways of mated or pheromone stimulated male golden hamsters: Contributions from vomeronasal sensory input and expression related to mating performance. Journal of Neuroscience. 14: 3643-3654

- Fields RD, Eshete F, Stevens B & Itoh K. (1997). Action potential-dependent regulation of gene expression: temporal specificity in Ca^{2+} , camp-responsive element binding proteins and mitogen-activated protein kinase signaling. Journal of Neuroscience. 17: 7252-7266.
- Fleming A, Vaccarino F, Tamboso L, Chee Ph. (1979). Vomeronasal and olfactory system modulation of maternal behavior in rat. Science. 203: 372-374.
- Floody OR & Pfaff DW. (1977). Communication among hamsters by high-frequency acoustic signals : III. Responses evoked by natural and synthetic ultrasounds. Journal of Comparative Physiology and Psychology. 91: 820-829.
- Floody OR, Pfaff DW & Lewis CD. (1977). Communication among hamsters by high-frequency acoustic signals: II. Determinants of calling by females and males. Journal of Comparative Physiology and Psychology. 91: 807-819.
- Geyer LA, Barfield RJ & McIntosh TK. (1978). Influence of gonadal hormones and sexual behavior on ultrasonic vocalization in rats II. Treatment of males. Journal of Comparative Physiology and Psychology. 92: 447-456.
- Giantonio G.W., Lund N.L. & Gerall A.A. (1970). Effect of diencephalic and rhinencephalic lesions on the male rat's sexual behavior. J. Comp. Physiol. Psychol. 73: 38-46.
- Giordano M., Güemes M., López-Arias V. & Paredes, R.G. (1998). Sociosexual behavior in male rats after lesions of the dorsolateral tegmentum. Physiol. Behav. 65: 89-94.
- Giovannelli L & Bloom FE. (1992). c-Fos protein expression in the rat subfornical organ following osmotic stimulation. Neuroscience letter. 139: 1-6.
- Gray GD, Davis HN & Dewsbury DA. (1976). Masculine sexual behavior in male and female rats following perinatal manipulation of androgen: effects of genital anesthetization and sexual experience. Hormones and Behavior. 7: 317-329.
- Greenberg ME, Ziff EB. 1984. Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. Nature. 311: 433-438.
- Halpern M. (1987). The organization and function of the vomeronasal system. Annual Rev. Neuroscience. 10: 325-362.
- Hansen S. (1982). Hypothalamic control of motivation: the medial preoptic area and masculine sexual behaviour. Scandinavian Journal of Psychology. (Suppl). 1: 121-126.

- Hard E & Larsson K. (1968). Effects of mounts without intromissions upon sexual behavior in male rats. Animal Behavior. 16: 538-540.
- Hard E & Larsson K. (1969). Effects of precoital exposure of male rats to copulating animals upon subsequent mating performance. Animal Behavior. 17: 540-541.
- Hardy DF & Debold JF. (1971). Effects of mounts without intromission upon the behavior of female rats during the onset of estrogen-induced heat. Physiology and Behavior. 7: 643-645.
- Harris VH & Sachs BD. (1975). Copulatory behavior in male rats following amygdaloid lesions. Brain Research. 86, 514-518.
- Hart BL & Ladewig J. (1979). Effects of medial preoptic-anterior hypothalamic lesions on development of sociosexual behavior in dogs. Journal of Comparative Physiology and Psychology. 93, 566-573.
- Heimer L & Larsson K. (1966/67). Impairment of mating behavior in male rats following lesions in the preoptic anterior hypothalamic continuum. Brain Research. 3, 248-263.
- Hemsworth PH, Galloway DB. (1979). The effect of sexual stimulation on the sperm output of the domestic boar. Anim Reprod. Sci. 2: 387-394.
- Hetta J & Meyerson BJ. (1978). Effects of castration and testosterone treatment on sex specific orientation in the male rat. Acta Physiol. Scand. Suppl. 453: 47-62.
- Hillarp NA, Olivercrona H & Silfverskiold W. (1954). Evidence for the participation of the preoptic area in male mating behavior. Experientia (Basel). 10: 224-227.
- Hlinak, Z. (1983). Precopulatory behavior of male laboratory rats in puberty and adulthood. Activ. Nerv. Sup.25: 180-181.
- Hlinak Z. (1986). Precopulatory behavior of laboratory rat: an ethological approach. Activitas Nervosa Superior. 28: 108-116.
- Hlinak Z, Madlafousek J & Spinka M. (1987). Transition from precopulatory to copulatory behavior in male rats with lesions in medial preoptic area: dependence on precopulatory pattern of female. Activitas Nervosa Superior. 29: 257-262.
- Hlinak Z. (1990). Precopulatory behavior of male rats: developmental aspects and dependence on females's solicitation. Activitas Nervosa Superior. 32: 264-282.

Hughes P, Dragunow M. (1995). Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. Pharmacological Reviews. 47: 133-178.

Hughes P, Lawlor P, Dragunow M. (1992). Basal expression of Fos, Fos-related Jun and Krox 24 proteins in rat hippocampus. Molecular Brain Research. 13: 355-357.

Hurtazo HA. (2000). "Análisis de la preferencia olfatoria y de la preferencia de lugar condicionada en ratas macho con lesiones del área preóptica media del hipotálamo anterior". Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias-UNAM. México, D.F.

Ikeda J, Nakajima T, Osborne OC, Mies G, Nowak TS Jr. (1994). Coexpression of c-fos and hsp70 m RNAs in gerbil brain after ischemia: Induction threshold, distribution and time course evaluated by in situ hybridization. Molecular Brain Research. 26: 249-258.

Imaki T, Shibasaki T, Hotta M, Demura H. (1993). Intracerebroventricular administration of corticotropin-releasing factor induce c-fos mRNA expression in brain regions related to stress response: comparison with patterns of c-fos m RNA induction after stress. Brain Research. 616: 114-125.

Ingersoll DW. (1981). Role of the vomeronasal organ in murine priming and signalling hemocommunication system. Dissert. Abst. 41B: 3215.

Johnston J. (1923). Further contributions to the study of evolution of the forebrain. Journal Comparative Neurology. 35: 337-481

Johnston P & Davidson JM. (1972). Intracerebral androgens and sexual behavior in the male rat. Hormones and Behavior. 3: 345-357.

Ju G & Swanson LW. (1983). Studies on the cellular architecture of the bed nuclei of the stria terminalis in the rat. I. Cytology. Journal Comparative Neurology. 280: 587-602.

Kaczmarek L & Chaudhuri A. (1997). Sensory regulation of immediate-early gene expression in mammalian visual cortex: implications for functional mapping and neural plasticity. Brain Research Reviews. 23: 237-256.

Kerruish BM. (1955). The effect of sexual stimulation prior to service on the behaviour and conception rate of bulls. Br. J. Anim. Behav. 3: 125-130.

Kovács KJ & Sawchenko PE. (1996). Sequence of stress induced alteration in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons. Journal of Neuroscience. 16. 262-273.

- Kovács KJ. (1998). C-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. Neurochemistry International. 33: 287-297.
- Kurtz K & Adler NT. (1973). Electrophysiological correlates of copulatory behavior in the male rat. Journal of Comparative Physiology and Psychology. 84: 225-239.
- Larriva-Sahd J. & Matsumoto A. (1994). The vomeronasal system and its connections with sexually dimorphic neural structures. Zoology Science. 11: 495-506.
- Larsson K. (1956). Conditioning and sexual behavior in the male albino rat. Almqvist & Wiksell, Stockholm. pp. 1-269.
- Larsson K. (1979). Features of neuroendocrine regulation of masculine sexual behavior. In C.Beyer (Ed.), Endocrine Control of Sexual Behavior, Raven Press, N:Y.; 77-163, 477-497.
- Lee WMF, Lin C, & Curran T. (1988). Activation of the transforming potential of the human Fos proto-oncogene requires message stabilization and result in increased amounts of partially modified Fos protein. Molecular Cell Biology. 8: 5521-5527.
- Lisk RD. (1968). Copulatory activity of the male rat following placement of preoptic-anterior hypothalamic lesions. Experimental Brain Research. 5: 306-313.
- Mader DR & Price EO. (1984). The effects of sexual stimulation on the sexual performance of Hereford bulls. J. Anim. Sci. 59: 294-300.
- Madlafousek J, Freund K & Grofova I. (1970). Variables determining the effect of electrostimulation in the lateral preoptic area on the sexual behavior of male rats. Journal of Comparative Physiology and Psychology. 72: 28-44.
- Maillard CA & Edwards DA. (1991). Excitotoxin lesions of the zona incerta/lateral tegmentum continuum: effects on male sexual behavior in rat. Behav. Brain Res. 46: 143-149.
- Malsbury CW. (1971). Facilitation of male rat copulatory behavior by electrical stimulation of the medial preoptic area. Physiology and Behavior. 7: 797-805.
- McIntosh TK & Barfield RJ. (1980). The temporal pattern of 40-60 kHz ultrasonic vocalizations and copulations in the rat (*Rattus norvegicus*) Behavioral Neural Biology. 29: 349-358.

- McEwen BS, Pfaff DW & Zigmond RE. (1970). Factors influencing sex hormone uptake by rat brain regions. III. Effects of competing steroids on testosterone uptake. Brain Research. 21: 29-38.
- Merari A & Ginton A. (1975). Characteristics of exaggerated sexual behavior induced by electrical stimulation of the medial preoptic area in the male rat. Brain Research. 86, 97-108.
- Meredith M. (1983). Sensory physiology of pheromone communication. En: J.G. Vandenberg (Ed.) Pheromones and Reproduction in Mammals. Academic Press, New York. pp. 199-252.
- Meredith M. (1986). Vomeronasal organ removal before sexual experience impairs male hamster mating behavior. Physiology and Behavior. 36; 737-743.
- Meredith M. (1991). Sensory Processing in the main and accessory olfactory systems: comparisons and contrasts. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 39: 601-614.
- Michael RP & Wilson M. (1974). Effects of castration and hormone replacement in fully adult male rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). Endocrinology. 95: 150-159.
- Nishina H, Sato H, Suzuki T, Sato N, Iba H. 1990. Isolation and characterization of Fra-2, an additional member of the fos gene family. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 3619-3623.
- Nyby J. (1983). Ultrasonic vocalizations during sex behavior of male house mice (*Mus musculus*): A description. Behavioral Neural Biology. 39: 128-134.
- Paredes RG & Agmo A. (1989). Stereospecific actions of baclofen on sociosexual behavior, locomotor activity and motor execution. Psychopharmacology. 97, 358-364.
- Paredes RG & Baum MJ. (1997). Role of the medial preoptic area/anterior hypothalamus in the control of masculine sexual behavior, in: Rosen R.C., Davis C.M. & Ruppel H.J. (Eds.). Annual Review of Sex Research. Vol. 8. Society Scientific Study of Sexuality, Mason City. pp: 68-101.
- Paredes RG, Lopez ME, Baum MJ. (1998). Testosterone augments neuronal Fos responses to estrous odors throughout the vomeronasal projection pathway of gonadectomized male and female rats. Hormones and Behavior. 33: 48-57.
- Paredes RG, Piña AL. & Bermúdez-Rattoni. F. (1993). Hypothalamic but not cortical grafts induce recovery of sexual behavior and connectivity in medial preoptic area-lesioned rats. Brain Research. 620: 351-355.

Paxinos G & Watson Ch. (1986). The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press London.

Paxinos G. (1995). The rat nervous system. Academic Press London. pp. 899-921.

Phoenix CH, Goy RW, Gerall AA & Young WC. (1959). Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. Endocrinology. 65: 369-382.

Pickett BW, Voss JL, Squires EL. (1977). Impotence and abnormal sexual behavior in the stallion. Theriogenology. 8: 329-347.

Pomerantz SM & Clemens LG. (1981). Ultrasonic vocalizations in male deer mice (*Peromyscus maniculatus bairdi*): Their role in male sexual behavior. Physiology and Behavior. 27: 869-872.

Powers JB & Winans SS. (1975). Vomeronasal Organ: Critical role in mediating sexual behavior of the male hamster. Science. 187: 961-963.

Price EO, Smith VM & Katz LS. (1984). Sexual stimulation of male dairy goats. Applied Animal Behaviour. 13: 83-92.

Price EO, Borgwardt R, Orihuela A & Dally RD. (1998). Sexual stimulation in male sheep and goats. Applied Animal Behaviour Science. 59: 317-322.

Price JL, Russchen FT & Amaral DG. (1987). The limbic region II. The amygdaloid complex. Handbook of chemical neuroanatomy: integrated systems of the CNS. A Björklud T. Hökfelt, Elsevier Amsterdam. pp. 279-388.

Romero PR, Beltramino CA & Career HF. (1990). Participation of the olfactory system in the control of approach behavior of the female rat to the male. Physiology and Behavior. 47: 685-690.

Roos J, Roos M, Schaeffer C. & Aron, C. (1988). Sexual differences in the development of accessory olfactory bulbs in the rat. Journal of Comparative Neurology. 270: 121-131.

Sachs BD & Barfield RJ. (1976). Functional analysis of masculine copulatory behavior in the rat. Adv. Study Behav. 7: 91-154.

Sachs BD & Meisel RL (1988). The physiology of male sexual behavior. In E. Knobil and J. Neill (Eds.) The Physiology of reproduction, Raven, New York, pp. 1393-1485.

- Sagar SM, Sharp FR, Curran T. 1988. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. Science. 240: 1328-1331.
- Saito T & Moltz H. (1986). Copulatory behavior of sexually naive and sexually experienced male rats following removal of the vomeronasal organ. Physiology and Behavior. 37: 507-510.
- Scalia F & Winans SS (1975). The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. Journal of Comparative Neurology. 161: 31-56.
- Scammell TE, Price KJ & Sagar SM. (1993). Hyperthermia induces c-fos expression in the preoptic area. Brain Research. 618: 303-307.
- Schwartz NB & Kling A. (1964). The effect of amygdaloid lesions on feeding, grooming, and reproduction in rats. Acta Neurovegetativa. 26: 12-34.
- Segovia S & Guillamón A. (1993). Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway and sex differences in reproductive behaviors. Brain Research Reviews. 18: 51-74.
- Shen M & Greenberg ME. (1990). The regulation of function of *c-fos* and other immediate early genes in the nervous system. Neuron. 41: 477-485.
- Shiosaka S, Sakanaka M, Inagaki S, Senba E, Hara Y, Takatsuki K, Takagi H, Tawai Y, Thohyama M. (1983). Putative neurotransmitters in the amygdaloid complex with special reference to peptidergic pathways. En: Chemical Neuroanatomy. PC. Emson (Ed.). Raven Press. New York. pp. 359-389.
- ShIPLEY MT & ADAMEK GD. (1984). The connections of the mouse olfactory bulb: A study using orthograde and anterograde transport of wheatgerm agglutinin conjugated to horseradish peroxidase. Brain Research Bulletin. 12: 221-226.
- Slob AK, Vander Werff. (1997). The fundamental role of gonadal steroids in sexual behavior. Bailliere's Clin Psychiatry. 3: 1-24.
- Sonnenberg JL, Rausher F, Morgan JJ, Curran T. 1989. Regulation of proenkephalin by fos and jun. Science. 246: 1622-1624.
- Stone CP. (1939). Copulatory activity in adult male rats following castration and injections of testosterone propionate. Endocrinology. 24: 165-174.
- Swanson LW. (1988/89). The neural basis of motivated behavior. Acta morphol. Neer. Scand. 26: 165-176.

Thorton JE. (1986). Heterotypical sexual behavior: implications from variations. En Komisurak, Ed. Siegel, Cheng y Feder. Olfaction and endocrine regulation IRL Press, London. Pp. 11-21.

Van Dis H. & Larsson K. (1971). Induction of sexual arousal in the castrated male rat by intracranial stimulation. Physiology and Behavior. 6: 85-86.

van Straaten F, Müller R, Curran T, van Beveren C, Verma JM. 1983. Complete nucleotide sequence of a human c-oncogene: deduced amino acid sequence of the human c-fos protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 3183-3187.

Wersinger SR, Baum MJ, Erskine MS. (1993). Mating-induced FOS-like immunoreactivity in the rat forebrain: a sex comparison and a dimorphic effect of pelvic nerve transection. J Neuroendocrinol. 5: 557-568.

Whitney G, Coble JR, Stockton M.D. & Tilson EF. (1973). Ultrasonic emissions: Do they facilitate courtship in mice?. Journal of Comparative Physiology and Psychology. 84:445-452.

Winans SS & Powers JB. (1977). Olfactory and vomeronasal desfferentiation of male hamster: histological and behavioral analyses. Brain Research. 126: 325-344.

Winans SS & Scalia F. (1970) Amygdaloid nucleus: new afferent input from the vomeronasal organ. Science. 170: 330-332.

Wysocki CJ. (1979). Neurobehavioral evidence for the involvment of the vomeronasal system in mamalian reproduction. Neuroscience Biobehavior. Review. 3: 301-341.

Zerial M, Toshi L, Ryseck R, Schuermann M, Muller R, Bravo R. 1989. The product of a novel grow activated gene, fosB, interacts with jun proteins enhancing their DNA binding affinity. EMBO Journal. 8: 805-813.

Wysocki CJ & Meredith M. (1987). The vomeronasal system. En T.E. Finger y W.L. Silver (eds.). Neurobiol. of taste and smell, John Wiley, New York. Pp. 125-150.

Zerial M, Toschi L, Ryseck R, Schuermann M, Muller R & Bravo R. (1989). The product of a novel growth activated gene, fosB, interacts with jun proteins enhancing their DNA binding affinity. EMBO Journal. 8: 805-813.