

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ESTIMULACIÓN SEXUAL REPETIDA Y NEUROGÉNESIS
EN EL BULBO OLFATORIO DE LA RATA HEMBRA

Tesis que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias (Neurobiología) presenta la
L.Q. Dulce María Arzate Vázquez

Directores de Tesis

Dr. Raúl G. Paredes Guerrero

Dra. Wendy Portillo Martínez

Campus Juriquilla, Querétaro. Agosto 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Neurobiología

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: Dulce María Arzate Vázquez, cuyo título es: “Estimulación sexual repetida y neurogénesis en el bulbo olfatorio de la rata hembra” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dra. María Magdalena Giordano Noyola

Secretario

Dra. Wendy Portillo Martínez

Vocal

Dr. Oscar González Flores

Suplente

Dr. José Fernando Peña Ortega

Suplente

Dr. Francisco G. Vázquez Cuevas

Aprobado por el Comité Académico

Dra. María Teresa Morales Guzmán

Coordinador del Programa

RESUMEN

ESTIMULACIÓN SEXUAL REPETIDA Y NEUROGÉNESIS EN EL BULBO OLFATORIO DE LA RATA HEMBRA

Una sola sesión de cópula regulada incrementa el número de células nuevas en la capa celular interna (CCI) del bulbo olfatorio accesorio (BOA). En este trabajo, se analizó el efecto de la cópula regulada repetida sobre el número de neuronas nuevas en el BOA y el bulbo olfatorio principal (BOP) dieciséis días después del primer contacto sexual. Ratas hembra adultas, ovariectomizadas y suplementadas con estradiol y progesterona fueron divididas aleatoriamente en cuatro grupos: 1) sin contacto sexual, 2) una sesión de cópula regulada, 3) cuatro sesiones de cópula regulada y 4) cuatro sesiones de cópula no regulada. Adicionalmente, se incluyó un grupo de hembras gonadalmente intactas sin contacto sexual. Los resultados mostraron un aumento en el número de células nuevas (BrdU positivas) en la CCI del BOA y en la capa granular del BOP en hembras sometidas a cuatro sesiones de contacto sexual regulado con respecto a todos los grupos. En cuanto al número de neuronas nuevas (BrdU/NeuN positivas) en estas capas, se encontraron diferencias significativas en la capa granular y CCI del grupo de hembras que ejecutaron cuatro sesiones de cópula regulada en comparación con los demás grupos. Se ha propuesto que hormonas como el estradiol y la progesterona tienen un papel mediador en la neurogénesis, debido a esto se cuantificaron sus niveles plasmáticos. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas entre los grupos suplementados. En conclusión, la cópula regulada repetida incrementa la sobrevivencia de las neuronas granulares nuevas originadas por el primer contacto sexual y este efecto no depende de cambios en los niveles de estradiol o de progesterona.

SUMMARY
REPEATED SEXUAL BEHAVIOR AND
OLFACTORY BULB NEUROGENESIS IN THE FEMALE RAT

We have previously shown that the first paced mating encounter increases the number of newborn cells in the internal cell layer (ICL) of the accessory olfactory bulb (AOB) in the female rat. In the present study we evaluated if the repetition of the stimulus (paced mating) could increase the survival of newborn neurons in the olfactory bulb generated during the first session of paced sexual contact. Sexually-naive female rats were bilaterally ovariectomized, hormonally supplemented and randomly assigned to one of four groups: 1) without sexual contact, 2) one session of paced mating during 1h, 3) four sessions of paced mating of 1h each, 4) four sessions of non-paced mating during 1h and 5) a group of gonadally intact females. Results showed an increase in the number of newborn cells (BrdU immunoreactive) in the ICL of the AOB and, granule cell layer (Gra) of the main olfactory bulb (MOB) of repeated paced mating group in comparison to all groups. Moreover, the number of newborn neurons that arrived at the ICL of the AOB and the Gra of the MOB increased only in the repeated paced mating group in comparison to all groups. Since it has been proposed that hormones, as estradiol (E2) and progesterone (P4) modulate adult neurogenesis, blood was collected at sacrifice to determine plasma levels of both hormones. However, no differences were found between groups indicating that our results are not affected by changes in these hormones. We suggest that repeated paced mating promotes newborn neurons survival in the AOB and MOB.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero para la realización de mis estudios de maestría, así como para la realización de una estancia de investigación en el extranjero (# becario 366700).

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Neurobiología, UNAM Campus Juriquilla por el espacio brindado, y a todos mis maestros por el conocimiento compartido y su entusiasmo.

Al Dr. Raúl Paredes y a la Dra. Wendy Portillo por darme la oportunidad de integrarme a su grupo de trabajo, y haberme guiado en el desarrollo de éste y otros proyectos a lo largo de tres años.

Al Dr. Fernando Peña y al Dr. Víctor Ramírez por todos los comentarios enriquecedores y palabras alientadoras. Asimismo, a los miembros del jurado Dr. Francisco G. Vázquez Cuevas, Dr. Oscar González Flores y Dra. Magda Giordano, quienes aportaron ideas valiosas durante la revisión de este manuscrito.

Al laboratorio D-11 y a todos los integrantes que en éste corto tiempo pasaron por el mismo y dejaron su huella en mí. A Edwards Antonio, Cynthia Rodríguez, Alberto Pescador, Nancy Unda, Patricia García-Horsman, Carlos García, Rebeca Corona y Wendy Herrera. Gracias por las charlas, sus enseñanzas académicas y tantos momentos que siempre recordaré con cariño.

Mi más sincero agradecimiento a todo el personal técnico y académico que fortaleció mi formación: al M.V.Z. Francisco Javier Camacho Barrios, a la Sra. Ma. Juana Cárdenas Luna del laboratorio D-11. A las técnicas académicas Ma. de Lourdes Palma Tirado, Lorena López Sánchez y Elsa Nydia Hernández Ríos, y la Sra. Ma. Esther Martínez Trejo, todas ellas de la unidad de microscopía. A la técnico académico. M. en C. Gema Martínez Cabrera, por su ayuda con las tinciones histológicas. A los miembros de la unidad de cómputo, especialmente al Ing. Ramón Martínez Olvera, al ISC. Omar González Hernández y a la Lic. Nancy Lorena Ortiz Martínez. Agradezco a la M.en C. Santiago Marisela Ahumada Solórzano y a la Dra. Maricela Luna Muñoz por enseñarme

y brindarme el espacio para realizar la determinación de los niveles plasmáticos hormonales.

A la M. en C. Leonor Casanova Rico por su tenacidad y alta efectividad ante cualquier situación por más difícil que ésta fuera. Su labor ha sido invaluable, gracias.

DEDICATORIA

A mis padres y a mi hermana Anahí por su amor, apoyo incondicional y fortaleza a través de la distancia. A mi compañero de aventuras, Edwards.

A mi familia que lucha, sufre y se levanta a pesar de los momentos difíciles y las pérdidas irreparables por las que hemos atravesado estos últimos años.

A mis amigos, que junto conmigo se van abriendo camino ansiando nuevas oportunidades y un mejor futuro.

¡Los amo!

ÍNDICE

Resumen español	iii
Resumen inglés	iv
Agradecimientos	v
Dedicatoria	vii
Introducción	1
Capítulo 1. Antecedentes	
1.1 El bulbo olfatorio (BO) de la rata.	2
1.1.1 Sistema olfatorio principal	3
1.1.2 Sistema olfatorio accesorio	4
1.2 Conducta sexual femenina en la rata.	5
1.2.1 Cópula regulada por la rata hembra	7
1.3 Neurogénesis en la rata adulta.	9
1.3.1 Neurogénesis en hipocampo	10
1.3.2 Neurogénesis en bulbo olfatorio	10
1.3.3 Factores hormonales que regulan la neurogénesis en el adulto	11
1.3.3.1 Estradiol	13
1.3.3.2 Progesterona	14
1.3.3.3 Andrógenos.....	15
1.3.3.4 Glucocorticoides	16
1.3.3.5 Prolactina	16
1.3.3.6 Melatonina	17
1.4 Efecto de la ejecución de la conducta sexual sobre la generación de células nuevas en el BO.....	18
Capítulo 2	
2.1 Justificación	21
2.2 Hipótesis	22
2.3 Objetivos	22
2.4 Sujetos, material y métodos	23

2.4.1 Sujetos.....	23
2.4.2 Administración del marcador de síntesis de ADN 5-bromo-2'- desoxiuridina (BrdU).....	23
2.4.3 Seguimiento del ciclo estral del grupo intacto.....	24
2.4.4 Sesiones de conducta sexual.....	25
2.4.5 Sacrificio de los animales.....	26
2.4.6 Inmunohistoquímica contra BrdU.....	27
2.4.7 Conteo de células inmunorreactivas a BrdU.....	28
2.4.8 Inmunofluorescencia para la detección de células BrdU/NeuN positivas.....	29
2.4.9 Conteo de células inmunorreactivas BrdU/NeuN.....	30
2.4.10 Cuantificación de la concentración plasmática de estradiol (E2) y progesterona (P4).....	31
2.5 Análisis estadístico.....	32
Capítulo 3. Resultados	
3.1 Parámetros de conducta sexual.....	34
3.2 Cuantificación de células BrdU positivas.....	35
3.2.1 Bulbo olfatorio accesorio.....	35
3.2.2 Bulbo olfatorio principal.....	36
3.3 Cuantificación de células Brdu/NeuN positivas.....	39
3.3.1 Capa celular interna del BOA.....	39
3.3.2 Capa granular del BOP.....	40
3.4 Concentración plasmática de estradiol y progesterona.....	41
Capítulo 4.	
4.1 Discusión.....	42
4.2 Conclusiones.....	48
Referencias.....	49
Lista de figuras.....	59
Lista de tablas.....	61
Apéndices.....	62

INTRODUCCIÓN

El proceso de neurogénesis en el cerebro adulto se ha descrito en diferentes especies de mamíferos incluyendo al ser humano (Bédard y Parent, 2004; Eriksson y cols., 1998; Sanai y cols., 2011). Actualmente, se reconocen dos nichos neurogénicos independientes: la zona subgranular (ZSG) del hipocampo y la zona subventricular (ZSV) localizada en las paredes de los ventrículos laterales. Dichas regiones generan nuevas interneuronas que se integran a la capa granular del giro dentado y a las capas granular [denominada así en el bulbo olfatorio principal (BOP) y capa celular interna en el bulbo olfatorio accesorio (BOA)] y periglomerular del bulbo olfatorio (BO), respectivamente (Whitman y Greer, 2009). Desde el resurgimiento del estudio de la neurogénesis, en la década de los 90's, se han desarrollado una serie de estudios con el objetivo de explicar la relevancia fisiológica de estas células nuevas. En el caso del BO, se ha descrito el constante recambio de las neuronas sensoriales del epitelio olfatorio en roedores (Moulton, 1975), e incluso en humanos (Hahn y cols., 2005). Dado que en estas neuronas radican los receptores olfatorios, se propone que este recambio es necesario debido a la exposición continua a compuestos químicos nocivos que causan toxicidad celular (Kempermann, 2006). Además, se han propuesto otras hipótesis que tratan de explicar la neurogénesis entre las que se incluyen: una necesidad fundamental de neuronas nuevas para la consolidación de la memoria a largo plazo en tareas olfativas (Kermen y cols., 2010), una estrategia adaptativa para el cuidado de las crías (Shingo y cols., 2003), así como una estrategia reproductiva para el reconocimiento de la pareja en el ratón (Mak y cols., 2007; Oboti y cols, 2011). Nuestro grupo de investigación, demostró que cuando la hembra regula los contactos copulatorios aumenta el número de células nuevas en la capa celular interna (CCI) del BOA mientras que las hembras que copulan sin regular los contactos copulatorios no muestran cambio en el número de células (Corona y cols., 2011). Es por esto que, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la cópula regulada repetida, sobre el número de neuronas nuevas en el BO, dieciséis días después del primer contacto sexual, ya que estudios previos han demostrado que este es un periodo crítico durante el cual la actividad sensorial y centrífuga promueve la supervivencia e integración de las neuronas nuevas (Oboti y cols., 2011; Yamaguchi y Mori, 2005).

CAPÍTULO 1

1.1 EL BULBO OLFATORIO (BO) DE LA RATA

La función del BO es fundamental para la expresión de conductas innatas como la alimentación, el apareamiento, la crianza y la identificación de depredadores, ya que a través de esta área cerebral y sus conexiones con la corteza olfatoria, los animales pueden detectar señales quimiosensoriales, como las feromonas, y desplegar conductas estereotipadas (Dulac y Wagner, 2006).

La detección de señales olfatorias en los roedores, inicia en las neuronas sensoriales del epitelio olfatorio principal (EOP) y aquellas localizadas en el órgano vomeronasal (OVN), las cuales pertenecen a dos sistemas diferentes, el sistema olfatorio principal y el sistema olfatorio accesorio, respectivamente (Figura 1). Anteriormente, se pensaba que debido a la posición de ambas estructuras sensoriales, el EOP sólo detectaba odorantes, es decir pequeñas moléculas volátiles inhaladas durante la respiración. Mientras que, el OVN sólo procesaba moléculas en solución acuosa bombeadas hasta la cavidad nasal, principalmente feromonas (Dulac y Wagner, 2006). Sin embargo, en la actualidad se acepta que ambos sistemas están involucrados en el despliegue de diversas conductas que involucran la detección de los dos tipos de moléculas. Por ejemplo, se ha sugerido que en conjunto el sistema olfatorio principal y accesorio regulan la respuesta neuroendocrina en roedores al olor de un depredador (Masini y cols., 2009) y por otro lado contribuyen a la expresión de la receptividad sexual en el ratón hembra (Keller y cols., 2006a).

En cuanto a la organización neuroanatómica general del BO, los tres elementos principales de la vía olfatoria son: la entrada de los axones de las neuronas sensoriales que hacen contacto con las dendritas de las células mitrales y empenachadas a través de los glomérulos; los axones de las células mitrales y empenachadas que forman el tracto olfatorio lateral; y otras variedades neuronales como las células granulares y las células periglomerulares que constituyen las principales poblaciones de interneuronas del BO (Valverde, 2003). Asimismo, se han descrito un par de poblaciones de neuronas que comparten información eferente que proviene del BOA y el BOP: las células accesorias principales (MACs) y las neuronas intersticiales del bulbo (INBs),

representando un sitio de convergencia de los dos sistemas olfativos (Larriva-Sahd, 2008).

1.1.1 Sistema olfatorio principal

El sistema olfatorio principal recibe la información olfatoria externa a través de las neuronas sensoriales del EOP que expresan sólo un tipo de receptor acoplado a una proteína G olfatoria o Golf (Buck y Axel, 1991). A su vez, estas neuronas hacen sinapsis en los glomérulos con las neuronas mitrales y empenachadas que proyectan a la corteza piriforme, al tubérculo olfativo, parte de la amígdala cortical (anterior, posterolateral) y a la transición corticoamigdalina. Cada tipo de receptor se expresa en una única neurona olfatoria y esta proyecta a un solo glomérulo para hacer sinapsis con una neurona de proyección en específico. Por su parte, las poblaciones más importantes de interneuronas, es decir, las células granulares localizadas en la capa que lleva su mismo nombre y las células periglomerulares localizadas en la capa glomerular, regulan la información que envían las neuronas de proyección a las regiones corticales (Martínez- Marcos, 2009).

En el ratón hembra, el sistema olfatorio principal tiene una función fundamental para identificar el estado endocrino de conspecíficos y para la ejecución de la conducta sexual. Se ha reportado que la destrucción del EOP con sulfato de zinc elimina la respuesta de la hembra a olores volátiles de orina de macho, así como a olores no volátiles, disminuye la investigación olfatoria y la preferencia por el macho. Asimismo, el grado de receptividad evaluado mediante la intensidad del reflejo de lordosis (ver apartado 1.2 Conducta sexual en la rata hembra) disminuye aun cuando el sistema vomeronasal se encuentre intacto (Keller y cols., 2006a). Esto sugiere que la detección de las señales quimiosensoriales a través del sistema EOP-BOP es necesaria para la activación del sistema vomeronasal (Slotnick y cols., 2010), lo cual se sustenta con la existencia de proyecciones centrífugas al BOA provenientes de blancos del BOP en la amígdala medial (Martel y Baum, 2009).

1.1.2 Sistema olfatorio accesorio

Las neuronas sensoriales del sistema olfatorio accesorio se encuentran en el OVN. Existen dos familias de receptores vomeronasales que se expresan en diferentes capas del epitelio vomeronasal, los cuales están acoplados a diferentes proteínas G (Xia y cols., 2006). Las neuronas sensoriales con receptores acoplados a una proteína G inhibitoria ($G_{i2\alpha}$) de la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) hacen sinapsis con las células mitrales de la porción anterior del BOA. Mientras que, las neuronas sensoriales con receptores $G_{0\alpha}$ proyectan a las células mitrales de la porción posterior del BOA. A su vez, las neuronas mitrales y empenachadas, localizadas en la capa celular externa (CCE), proyectan exclusivamente a la amígdala cortical posteromedial y a dos estructuras de la amígdala subcortical, la amígdala medial y la división posteromedial del núcleo de la estría terminal. Cabe mencionar que, a diferencia del sistema olfatorio principal, la información procesada por el sistema olfatorio accesorio es convergente y altamente integrada, ya que diversas neuronas vomeronasales proyectan sus axones a varios glomérulos en el BOA anterior o en el BOA posterior. A su vez, los glomérulos reciben múltiples dendritas apicales de neuronas mitrales y empenachadas, las cuales son reguladas mediante sinapsis dendrodendríticas por las células granulares de la CCI (capa celular interna) y las células periglomerulares (Martínez- Marcos, 2009). La vía olfativa continua con proyecciones al hipocampo y a la corteza frontal a través del tálamo mediodorsal, una vía que permite la percepción consciente de los olores (Shepherd, 1994). La integridad del sistema olfatorio accesorio también es fundamental en el control de la conducta sexual. Estudios en los cuales se ha lesionado el órgano vomeronasal, describen una disminución en la receptividad sexual en varias especies de mamíferos como el hámster, la rata y el ratón hembra (Keller y cols., 2006a; Mackay-Sim y Rose, 1986; Saito y Moltz, 1986).

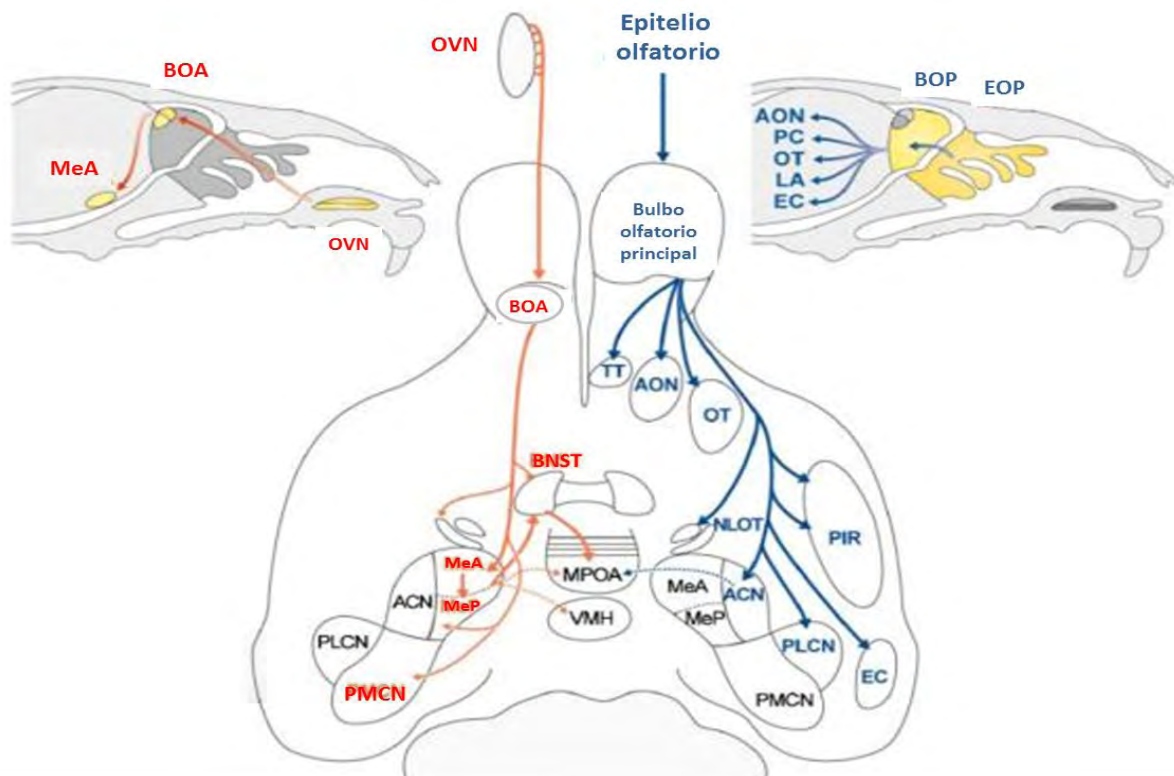


Figura 1. Sistemas olfatorios de la rata. El sistema vomeronasal (izquierda) incluye al BOA que recibe aferencias sensoriales del órgano vomeronasal (OVN) y proyecta a la amígdala medial (MeA/MeP) y al núcleo cortical amigdalóide posteromedial (PMCN) con conexiones adicionales al núcleo lecho de la estría terminal posterior (BNSTp). El sistema olfatorio principal (derecha) incluye al BOP que recibe aferencias sensoriales del epitelio olfatorio principal (MOE) y proyecta al núcleo cortical anterior (AON), al tubérculo olfatorio (OT), a la tenia tecta (TT), a la corteza piriforme (Pir) y a la corteza entorrinal (EC). Ambos sistemas tienen conexiones con el hipotálamo. Modificado de Dulac y Wagner, 2006.

1. 2 CONDUCTA SEXUAL FEMENINA EN LA RATA

La conducta sexual femenina tiene dos componentes principales: los motivacionales y los consumatorios. Los primeros consisten en una serie de conductas que atraen al macho como: pequeños brincos, carreras, movimiento de orejas, desplazamientos en zig-zag y vocalizaciones ultrasónicas. A estas conductas también se les conoce como conductas proceptivas (Erskine, 1989). Mientras que, el componente consumatorio expresado ante la monta del macho, conocido como lordosis, consiste en la dorsiflexión de la médula espinal con la consecuente elevación pélvica, exposición de la región anogenital y la apertura vaginal. La postura de lordosis permite la inserción del pene en la vagina de la hembra (Ball, 1937).

El estradiol (E2) y la progesterona (P4) regulan la fisiología y la conducta sexual femenina, es por esto que las hembras ovariectomizadas y con reemplazo secuencial de benzoato de estradiol (BE) y P4 presentan altos niveles de proceptividad y receptividad cuando se exponen a un macho sexualmente activo (Paredes y Fernández- Guasti, 2008; Whalen, 1974; Ydstebø y Södersten, 1977).

El ciclo estral dura entre cuatro y cinco días (Figura 2). Se puede dividir en cuatro fases que se caracterizan por presentar diferentes niveles plasmáticos de hormonas ováricas e hipofisarias. Asimismo, cada etapa se puede identificar por ciertas características de las células del epitelio vaginal que se observan obteniendo un frotis.

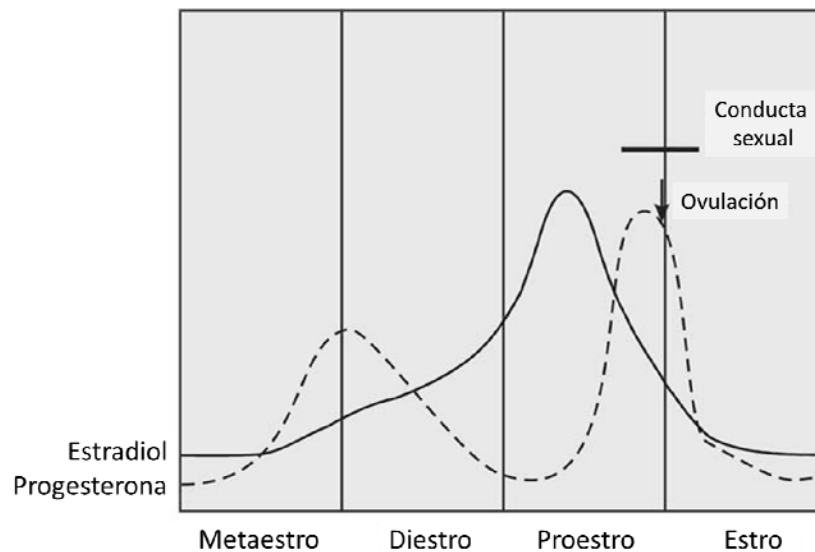


Figura 2. Representación de la relación entre el estradiol y la progesterona durante el ciclo estral de la ratona hembra. Modificado de Blaustein y Mani, 2007.

Las cuatro fases en las que se divide el ciclo estral son las siguientes: 1) Proestro. Dura doce horas aproximadamente. Al inicio de esta fase los niveles de estradiol alcanzan su nivel máximo. Mientras que, al final, aumenta la frecuencia de los pulsos de GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas), y consecuentemente de FSH (hormona folículo estimulante) y LH (hormona luteinizante), lo que desencadenará la ovulación. El frotis de la fase de proestro presenta una gran cantidad de células epiteliales nucleadas y pocos leucocitos, en el proestro tardío se pueden observar células queratinizadas como indicio de que la fase de estro está por iniciar. 2) Estro. Dura entre nueve y quince horas. Entre la fase de proestro tardío y estro tiene lugar la ovulación de entre 10-20 óvulos y se registran los máximos niveles de progesterona en

plasma. La hembra se encuentra sexualmente activa y acepta la monta del macho. Debido a la caída de estrógenos, las capas más externas del epitelio vaginal se queratinizan y descaman. Es por esto que, el frotis de la fase de estró se caracteriza por abundantes células epiteliales queratinizadas (escamas cornificadas sin núcleo), pocas células nucleadas y ningún leucocito. 3) Metaestro. Dura aproximadamente veinticuatro horas. El cuerpo lúteo secreta progesterona. A través del epitelio vaginal migran leucocitos hacia el lumen, por esta razón el frotis de la fase de metaestro muestra una moderada cantidad de leucocitos y pocas células epiteliales queratinizadas. 4) Diestro. Dura alrededor de cincuenta y seis horas. En esta fase continúa el crecimiento folicular promovido por la FSH, así como la liberación de concentraciones crecientes de estradiol. Un frotis vaginal de la fase de diestro se caracteriza por la presencia de gran cantidad de leucocitos, muy pocas células queratinizadas y algunas células nucleadas (Allen, 1931; Blaustein y Mani, 2007; LeFevre y McClintock, 1988).

1.2.1 Cópula regulada por la rata hembra

Para fines prácticos del presente trabajo, cada vez que se mencione la cópula regulada se hará referencia al contacto sexual regulado por la hembra. Durante la cópula regulada, la hembra tiene la oportunidad de controlar la frecuencia de la estimulación sexual que recibe del macho, tal y como ocurre en condiciones seminaturales (McClintock y Anisko, 1982). Para simular esta condición, en el laboratorio se utiliza el método descrito por Erskine y Baum (1982), el cual consiste en una caja dividida por una barrera central con un orificio en la base. Este orificio es del tamaño suficiente para permitir únicamente el paso de la hembra. Así, al estar el macho confinado en uno de los compartimientos, la hembra puede escapar del macho entrando y saliendo hacia uno y otro compartimento (Arzate y cols., 2011; Paredes y Vázquez, 1999). De este modo la hembra puede espaciar y regular los contactos copulatorios, ya sea una monta, una intromisión o una eyaculación. De hecho, existe una relación directa entre la intensidad de la estimulación vaginocervical y la latencia del regreso de la hembra con el macho, es decir, la latencia de regreso después de una eyaculación es mayor que la latencia de regreso después de una intromisión, y ésta última es mayor que la latencia de regreso después de una monta (Peirce and Nuttall, 1961; Krieger et al., 1976; Erskine et al., 1989). Por otra parte, la duración de la

intromisión ejecutada por el macho es mayor en el grupo de hembras que regulan la cópula (616 ± 21 ms) en comparación con aquellas que no la regulan (527 ± 30 ms) (Erskine y cols., 1989).

En 1972, Hardy y DeBold demostraron que la acumulación de estimulación vaginocervical afecta la conducta sexual femenina, disminuyendo la intensidad media de lordosis, que es un indicador de la receptividad sexual (ver Parámetros de conducta sexual en la sección 2.4), e incrementando el rechazo hacia el macho, aspecto característico en las hembras que no regulan la cópula. Por otro lado, las conductas motivacionales de proceptividad son más numerosas en hembras que regulan la cópula (Hardy y DeBold, 1972).

La principal característica de la cópula regulada es inducir cambios fisiológicos y conductuales que favorecen la reproducción. En 1989, Erskine y cols., demostraron que en hembras gonadalmente intactas, la duración de la fase de estro es interrumpida de manera eficaz por diez intromisiones recibidas durante una sesión de cópula regulada, no siendo así cuando las hembras recibían la misma cantidad de estimulación durante una sesión de cópula no regulada. Estos hallazgos corroboran que la receptividad sexual disminuye significativamente más rápido en ratas hembra que regulan el contacto sexual (Erskine y Baum, 1982). Este mismo grupo de trabajo demostró que la cópula regulada es más efectiva para inducir pseudopreñez, un estado fisiológico caracterizado por un periodo de anestro que dura aproximadamente doce días y es inducido por la estimulación vaginocervical durante una cópula estéril (Kornberg y Erskine, 1994).

En cuanto al aspecto conductual, se ha reportado que la ejecución de la cópula induce un estado afectivo positivo en la rata macho y en la rata hembra cuando pueden controlar la frecuencia de la estimulación sexual, siendo el caso de la hembra durante la cópula regulada. Esto se ha evaluado mediante el paradigma de condicionamiento de preferencia de lugar (CPP; Agmo y Berenfeld, 1990; Arzate y cols., 2011; Martínez y Paredes, 2001). Dicho estado afectivo positivo inducido por la cópula puede estar mediado por opioides, ya que la administración del antagonista de los receptores a

opioides, naloxona, bloquea la inducción de CPP después de la cópula tanto en machos (Agmo y Gómez, 1993) como en hembras (García- Horsman y cols., 2008).

En conjunto, estos estudios sugieren que las diferencias en las respuestas neuroendocrinas y conductuales entre hembras que regulan y las que no regulan el contacto sexual se debe a una diferencia en las características de la estimulación vaginocervical que recibe la hembra durante la sesión de cópula, como la frecuencia, la duración y la cantidad de intromisiones (Coopersmith y cols., 1996).

Por otro lado, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la estimulación sexual recibida durante la cópula regulada aumenta el número de células nuevas en la CCI del BOA (Corona y cols., 2011). Esto sugiere que la cópula regulada incrementa la tasa neurogénica en el bulbo olfatorio.

1.3 NEUROGÉNESIS EN LA RATA ADULTA

En el año 1913, Don Santiago Ramón y Cajal publicó su libro “Estudios sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso” en el cual demostraba la factibilidad de la regeneración axonal y, por el contrario, afirmaba que las neuronas en el animal adulto no podían proliferar (Ramón y Cajal, 1913). Sin embargo, un año antes de dicha publicación, Ezra Allen mostraba la primera evidencia de divisiones celulares en el cerebro de la rata adulta, con ayuda de una nueva técnica de fijación y deshidratación a base de anilinas que permite observar los detalles citológicos de las células en división (Allen, 1916). Sin embargo, no fue sino hasta 1965 que Joseph Altman, describió la existencia de nuevas células granulares en el hipocampo de ratas adultas. Posteriormente, realizó estudios en los cuales reportó la migración de células generadas en la zona subependimal al BO y propuso que era en esta estructura cerebral en donde se diferenciaban a neuronas. Estos hallazgos fueron confirmados en 1977, con el uso de microscopía electrónica por Michael Kaplan quien demostró la naturaleza neuronal de las células marcadas con timidina tritiada, el primer marcador de proliferación celular que se empleó (Kempermann, 2006).

El término “neurogénesis en el adulto” es usado para describir el proceso mediante el cual, en el cerebro del mamífero adulto sano, nacen nuevas neuronas a partir de células troncales que residen en regiones específicas y que estas nuevas

células migran, se diferencian y maduran en nuevas neuronas integradas funcionalmente (Kempermann, 2006). Actualmente, sólo se reconocen dos regiones en los mamíferos adultos y sanos, incluyendo al ser humano (Bédard y Parent, 2004; Eriksson y cols., 1998) que de manera constante e independiente son capaces de dar lugar a interneuronas nuevas: la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo que genera células granulares y la zona subventricular (ZSV) localizada en las paredes de los ventrículos laterales que genera células que se integran a la capa granular (denominada así en el BOP y CCI en el BOA) y periglomerular del BO (Álvarez- Buylla y Lois, 1995).

1.3.1 Neurogénesis en hipocampo

En el hipocampo, las células precursoras residen en la ZSG y dan origen a células gliales y neuronales en la capa granular del giro dentado. Las nuevas células granulares migran durante tres días hasta llegar a la capa granular y alrededor del día diez extienden sus dendritas y axones. Mientras que, alrededor del día dieciséis se forman las primeras espinas dendríticas (Whitman y Greer, 2009). En cuanto a la función del giro dentado, Yassa y cols. (2011) reportaron que el giro dentado y el área CA3 modulan la habilidad para separar patrones espaciales, es decir, la capacidad de discriminar experiencias en contextos similares tanto en roedores como en seres humanos. Por otro lado, se propone que la neurogénesis en el giro dentado puede contribuir a los procesos de aprendizaje y memoria controlados por el hipocampo dada la conexión de las células granulares con el área CA3 (Arias- Carrión y cols., 2007). Además, cuando se bloquea la neurogénesis se observan deficiencias en la ejecución de pruebas conductuales como el laberinto acuático de Morris, actividad en campo abierto y la prueba de desajuste objeto/contexto (Spanswick y cols., 2011).

1.3.2 Neurogénesis en bulbo olfatorio

En el sistema olfatorio la población de células precursoras del tipo astrocitario, denominadas así porque expresan la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP), se encuentra en la ZSV de las paredes del ventrículo lateral (Alvarez- Buylla y García-Verdugo, 2002). Las células progenitoras viajan a través de la vía migratoria rostral (VMR) hacia el BO, ahí se diferencian en interneuronas granulares y periglomerulares

(Kempermann, 2006). Petreanu y Alvarez-Buylla (2002) definieron cinco etapas del proceso de diferenciación de las células granulares nuevas. En la etapa 1 (2-7 días), las células tienen un proceso apical prominente y un proceso terminal pequeño, y migran tangencialmente a través de la VMR; en la etapa 2 (5-7 días), migran radialmente a través de la capa granular; en la etapa 3 (9-13 días), dejan de migrar y llegan a su posición final, tienen una dendrita simple que aún no atraviesa la capa mitral; en la etapa 4 (11- 22 días), tienen un árbol dendrítico extenso sin espinas; y finalmente, en la etapa 5 (15-30 días) presentan la morfología de células granulares maduras con espinas dendríticas.

La relevancia fisiológica de la generación de neuronas nuevas en el BO se ha estudiado ampliamente. Por ejemplo, Kermen y cols. (2010) propusieron que la consolidación del aprendizaje olfativo determina la sobrevivencia de neuronas nuevas necesarias para la formación de la memoria a largo plazo. Por otro lado, Mak y cols. (2007) confirieron a la neurogénesis un papel importante en la conducta sexual, reportando la generación de neuronas nuevas en el bulbo olfatorio principal y en el hipocampo en ratones hembra expuestos a feromonas de machos dominantes. Por otro lado, Shingo y cols. (2003) proponen que la neurogénesis en el BO del ratón es un evento mediado por prolactina y que ocurre durante la gestación y después del apareamiento por ser una estrategia adaptativa para el cuidado de las crías, así como para el reconocimiento de la pareja.

1.3.3 Factores hormonales que regulan la neurogénesis en el adulto

Se han propuesto una serie de moléculas de diferente naturaleza como mediadoras de la neurogénesis, entre las cuales se pueden mencionar algunas hormonas (estradiol, progesterona y prolactina), neurotransmisores y neuropéptidos (dopamina, serotonina, y péptidos opioides), factores de crecimiento como: EGF (factor de crecimiento epidérmico), VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), entre otros. Cada uno de estos reguladores puede actuar en diferentes etapas del proceso de neurogénesis, ya sea en la proliferación, la migración, la sobrevivencia y/o la diferenciación de las células precursoras (Hagg, 2005).

Dada la relevancia de las hormonas esteroides en la regulación del ciclo reproductivo de la rata hembra, es importante mencionar los mecanismos de acción de dichas hormonas.

Los receptores a hormonas esteroides se encuentran de manera casi exclusiva dentro del núcleo y una variedad de interacciones proteína-proteína están involucradas en la regulación de la maquinaria transcripcional por parte de las hormonas esteroides, incluyendo proteínas de choque térmico y correguladores. Los receptores libres se encuentran como complejos inactivos asociados con proteínas de choque térmico y chaperonas (Blaustein y Mani, 2007).

En la vía clásica de activación de los receptores a hormonas esteroides, dependiente de la unión del ligando, la unión de la hormona al receptor conlleva un cambio conformacional, la disociación de las proteínas de choque térmico, la dimerización del receptor y la unión del complejo a las secuencias de ADN blanco (elementos de respuesta a la hormona). Esto facilita el reclutamiento de cofactores y factores de transcripción (TFs, por sus siglas en inglés) a los promotores de los genes blanco, produciendo un complejo transcripcional activo. Las proteínas cinasas y fosfatasas contribuyen a la activación del receptor mediante la fosforilación/desfosforilación del receptor y los correguladores. Algunos neurotransmisores y factores de crecimiento pueden activar segundos mensajeros y vías de proteínas cinasas por una vía rápida (independiente de ligando) para activar receptores y/o coactivadores, ver Figura 3 (Blaustein y Mani, 2007; Mani y cols., 2009; Mani y cols., 2012).

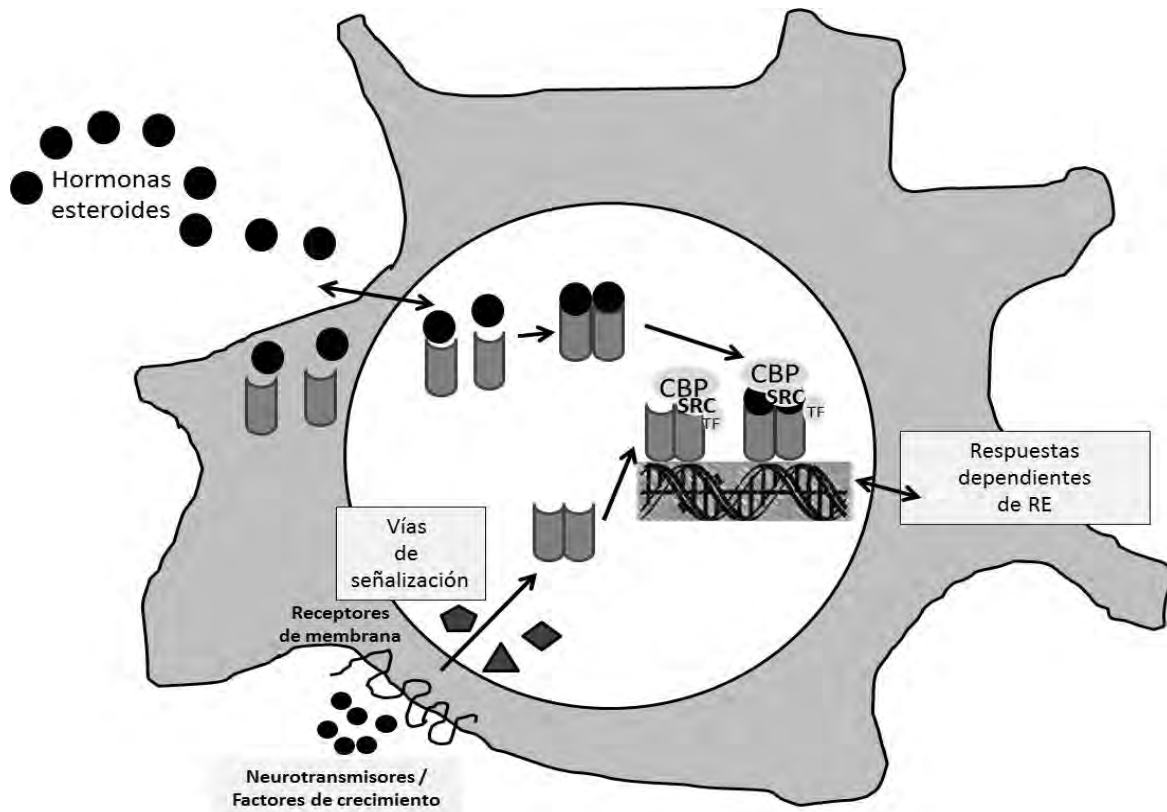


Figura 3. Representación del mecanismo de acción de los receptores a hormonas esteroides. En la vía clásica de activación de los receptores a hormonas esteroides la unión de la hormona al receptor conlleva un cambio conformacional, la disociación de las proteínas de choque térmico, la dimerización del receptor y la unión del complejo a las secuencias de ADN blanco (elementos de respuesta a la hormona). Algunos neurotransmisores y factores de crecimiento pueden activar segundos mensajeros y vías de proteínas cinasas por una vía rápida (independiente de ligando) para activar receptores y/o coactivadores. Adaptado de Blaustein y Mani, 2007. CBP (proteína de unión a CREB); SRC (coactivador del receptor a esteroides); TF (factor de transcripción).

1.3.3.1 Estradiol

Los estrógenos juegan un papel importante en la regulación de la estructura y función de muchos sistemas neuronales en el cerebro de la rata adulta. Existen dos isoformas del receptor nuclear a estrógenos (RE), el alfa (RE- α) y el beta (RE- β). En cuanto a la distribución del ARNm de ambos receptores en el cerebro, se puede decir que es extensa e incluye al núcleo lecho de la estría terminal, el núcleo amigdalino cortical y medial, el área preóptica, la sustancia gris periacueductal, el núcleo parabraquial y el locus coeruleus. Mientras que, en el hipotálamo ventromedial y el órgano subfornical sólo se expresa el ARNm del RE- α ; y en el bulbo olfatorio, el núcleo

supraóptico, paraventricular, supraquiasmático y el área tegmental ventral se expresa sólo el RE- β (Shughrue y cols., 1997).

Las células madre neurales (CMN) en el adulto, tanto de la ZSG como de la ZSV expresan las isoformas α y β del receptor a estradiol (Isgor y Watson, 2005). Se ha reportado que los estrógenos estimulan la neurogénesis en la hembra de roedores en las diferentes etapas del ciclo estral, de esta forma existe una mayor producción de neuronas nuevas durante la fase de proestro cuando los niveles de estrógenos presentan su concentración más alta (Tanapat y cols., 1999).

La hembra del ratón de la pradera, a diferencia de otros roedores, entra en receptividad sexual cuando se expone a señales quimiosensoriales del macho. Asimismo, muestra un incremento del 92% en el número de células inmunorreactivas a 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU), un marcador de proliferación celular, en la ZSV comparado con un grupo de hembras que fueron expuestas a otra hembra, como grupo control. Por otro lado, hembras ovariectomizadas expuestas a un macho sexualmente activo no muestran un incremento en el nivel de estrógenos en suero, ni un incremento en el número de células inmunorreactivas a BrdU en la VMR. Sin embargo, hembras ovariectomizadas tratadas con estrógenos presentan receptividad sexual y un mayor número de células inmunorreactivas a BrdU en la VMR, comparadas con las hembras del grupo control. Por lo que se concluye que el número de células nuevas durante la fase de estro está influenciado por los estrógenos (Smith y cols., 2001).

1.3.3.2 Progesterona

La progesterona ejerce sus efectos fisiológicos, principalmente, a través de su unión a receptores intracelulares a progestinas (RP), inducidos por estradiol. Es decir, la administración previa de estradiol incrementa los niveles de RP (Guerra-Araiza, 2003).

Los RP actúan como factores transcripcionales regulando la expresión de genes para iniciar o mantener una respuesta fisiológica. Sin embargo, también pueden ser activados, de manera independiente a la unión de progesterona, por segundos mensajeros como: 3',5'-adenosín monofosfato cíclico (AMPC), 3',5'-guanosín monofosfato cíclico (GMPc), óxido nítrico y dopamina (Mani y cols., 2012).

La mayor concentración cerebral de los RP se encuentra en el núcleo arcuato, el hipotálamo ventromedial, el área preóptica periventricular, el hipotálamo periventricular, el área preóptica supraquiasmática y el área preóptica medial, regiones en donde también la densidad de RE es alta (Blaustein y Mani, 2007).

Se ha reportado que las CMN y los progenitores neurales del hipocampo de rata adulta, no expresan el transcrito del RP, pero sí los componentes de membrana del receptor a progesterona 1 y 2 (PGRMC, por sus siglas en inglés). Esto sugiere que la progesterona puede actuar sobre la proliferación celular de manera independiente a la unión con su receptor a través de vías no clásicas (Liu y cols., 2009) o por vías clásicas, ya que se ha reportado la presencia del ARNm del receptor a progesterona en la capa subgranular del giro dentado (Hagihara y cols., 1992). De tal manera que, la administración de progesterona (4 mg/kg) durante tres días posteriores a la administración de BrdU en ratones macho adultos, duplica la cantidad de células inmunorreactivas a BrdU en el hipocampo. Mientras que, la androstenediona, la testosterona o el estradiol administrados en la misma dosis, no tienen el mismo efecto. Dada la supresión de este efecto por la administración de inhibidores de la proteína quinasa activada por mitógenos (MEK), se ha propuesto que la progesterona potencia la neurogénesis a través de la vía de señalización intracelular tirosina quinasa- quinasa regulada por señales extracelulares (Src-Erk) (Zhang y cols., 2010).

1.3.3.3 Andrógenos

En cuanto al papel de los andrógenos sobre la proliferación y la diferenciación de las CMN existen evidencias contradictorias. Por una parte, se ha reportado que las CMN expresan el receptor a andrógenos (RA) y que la nandrolona, un esteroide anabólico derivado de la testosterona, inhibe su proliferación aún y cuando son cultivadas en presencia del factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés). La nandrolona, *in vivo*, disminuye el número de CMN y de neuronas nuevas inmunorreactivas a BrdU en el hipocampo de ratas adultas ejerciendo su acción a través del RA, ya que su antagonista flutamida bloquea este efecto (Brannvall y cols., 2005).

Por otro lado, la implantación de cápsulas de un precursor de andrógenos y estrógenos, la dihidroepiandrosterona, en ratas macho induce un incremento en las células inmunorreactivas a BrdU en el giro dentado (Karishma y Herbert, 2002). De igual modo, la testosterona regula positivamente la neurogénesis induciendo la liberación del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, por sus siglas en inglés), que a su vez estimula la liberación del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés), el cual se ha relacionado con la potenciación de la diferenciación neuronal y supervivencia (Hagg, 2005).

1.3.3.4 Glucocorticoides

En general, los glucocorticoides inhiben la neurogénesis en el giro dentado. Un estudio realizado por Schoenfeld y Gould (2012) demostró que la exposición a odorantes de zorro, lo cual induce estrés en roedores. Tiene un efecto deletéreo sobre la proliferación celular, pero esto se evita cuando se previene el incremento en los niveles de glucocorticoides. Asimismo, la administración exógena de corticosterona en ratas adultas disminuye el número de células proliferativas y la supervivencia de neuronas granulares nuevas, siendo independiente de la edad del animal o de su género (Brummelte y Galea, 2010). Por otro lado, la reducción de los niveles de corticosteroides en hembras de edad avanzada incrementa significativamente la tasa de proliferación celular en el hipocampo (Cameron y McKay, 1999). Esto indica que el incremento en los niveles de glucocorticoides inducidos por estrés está asociado con la disminución de la neurogénesis. Sin embargo, aún se desconoce si los efectos observados son consecuencia de un efecto directo de estos sobre las células progenitoras o a través de un factor desconocido (Schoenfeld y Gould, 2011).

1.3.3.5 Prolactina

Diversos estudios han conferido un papel esencial a la prolactina en el proceso de neurogénesis en el adulto. Por ejemplo, se sugiere que la neurogénesis inducida en ratones hembra por la exposición a feromonas de macho dominante es dependiente de la prolactina en el BO. Mientras que, en el hipocampo es dependiente de hormona luteinizante, debido a la presencia de receptores para estas hormonas en los

correspondientes nichos neurogénicos relacionados con estas estructuras, ZSV y ZSG, respectivamente (Mak y cols., 2007).

También se ha propuesto que la prolactina, ya que presenta altas concentraciones plasmáticas durante la gestación, actúa como un potenciador de los factores de crecimiento como el EGF, activando tanto la proliferación de los progenitores neurales en la ZSV, como la presencia de interneuronas nuevas en el BO durante la gestación en el ratón hembra (Shingo y cols., 2003).

1.3.3.6 Melatonina

Evidencias recientes muestran que la administración de melatonina incrementa el número de células en el hipocampo de ratón que expresan doble cortina (DCX por sus siglas en inglés), un marcador de neuronas inmaduras. Asimismo, aumenta la complejidad de su árbol dendrítico, lo cual propicia la integración funcional de estas neuronas nuevas, evento que puede estar relacionado con el incremento observado en el volumen de la capa granular del giro dentado. Por otro lado, la melatonina incrementa los niveles de BDNF en cultivos neuronales y en el hipocampo. Por lo que se concluye que el papel de la melatonina en el proceso de neurogénesis es promover la sobrevivencia de las neuronas nuevas, así como incrementar su maduración dendrítica, ambos pasos esenciales para una integración funcional (Ramirez-Rodriguez y cols., 2011).

En conclusión, todas estas evidencias sugieren que los factores endocrinos son clave para detonar el potencial regenerativo de las células madre neurales. En el presente trabajo se cuantificaron los niveles plasmáticos de estradiol y progesterona para comparar las concentraciones entre los grupos de hembras ovariectomizadas y suplementadas con dichas hormonas, para inducir la receptividad sexual, con el grupo de hembras gonadalmente intactas cicladas en la fase de proestro tardío.

1.5 EFECTO DE LA EJECUCIÓN DE LA CONDUCTA SEXUAL SOBRE LA GENERACIÓN DE CÉLULAS NUEVAS EN EL BO

En 2011, nuestro grupo de investigación describió un incremento en el número de células nuevas en la CCI del BOA (análoga a la capa granular del BOP) en el grupo de hembras que reguló la cópula en comparación con grupos de ratas hembra que fueron expuestas a un macho sexualmente activo sin tener contacto sexual y aquellas que se sometieron a una sesión de cópula no regulada. Mientras que, no se encontraron diferencias en el número de células nuevas que se integran al BOP, entre los grupos ya mencionados. Estos datos sugieren que la ejecución de la conducta sexual regulada por parte de la hembra modifica la tasa basal de neurogénesis en el BOA (Corona y cols., 2011).

Cabe mencionar que estudios recientes han relacionado la ejecución de la conducta sexual con la generación de nuevas neuronas granulares en el hipocampo. Tal es el caso de Leuner y cols., 2010 quienes proponen que el valor hedónico de la ejecución de la conducta sexual es capaz de generar plasticidad cerebral. Esto puede relacionarse con la generación de células granulares nuevas, y posibles neuronas, en el BOA de la rata hembra cuando esta regula el contacto sexual, dada la formación de un estado afectivo positivo, mediado por péptidos opioides, bajo esta condición de interacción sexual (García-Horsman y cols., 2008; Martínez y Paredes, 2001; Paredes y Vázquez, 1999; Paredes y Fernández-Guasti, 2008; Paredes, 2009).

Como se mencionó anteriormente, la principal característica de la cópula regulada es inducir cambios fisiológicos y conductuales que favorecen la reproducción. Esto se debe a la estimulación que recibe la rata hembra bajo esta condición de interacción sexual, que es procesada por grupos celulares en el área preóptica medial (MPOA, por sus siglas en inglés), la amígdala (AMYG), el núcleo lecho de la estría terminal (BNST) y el hipotálamo ventromedial (VMH), a través de vías aferentes que llegan vía nervio pélvico (Rowe y Erskine, 1993). Se ha reportado que el patrón de estimulación vaginocervical está definido por la cantidad de intromisiones que recibe la hembra y el intervalo interintromisión (ver Materiales y Métodos), siendo diferente entre la cópula regulada y la cópula no regulada. En este sentido, este patrón de estimulación en periodos temporales repetidos, discretos y espaciados es requerido para inducir la

secreción de prolactina durante la preñez y pseudopreñez a través de la activación del receptor a glutamato, NMDA, en la amígdala medial posterodorsal (MePD). Siendo éste núcleo, junto con las estructuras cerebrales anteriormente mencionadas, las encargadas de iniciar los cambios fisiológicos relacionados con la reproducción (Lehmann y cols., 2005).

En el 2007, Whitman y Greer reportaron que las células granulares nuevas en el BOP reciben sinapsis axodendríticas de fibras centrífugas y/o colaterales axónicas de las células mitrales y empenachadas sobre su soma y las dendritas basales. Estas conexiones se forman diez días después de su nacimiento en la ZSV y antes de la formación dendrítica en la capa plexiforme externa (CPE). Posteriormente, a los 21 días reciben sinapsis recíprocas dendrodendríticas en la CPE. De esta manera, las neuronas nuevas reciben información de la red neuronal antes de contribuir a ella y estructuras cerebrales superiores pueden influir sobre su maduración y sobrevivencia (Kelsch y cols., 2008). Las fibras centrífugas que recibe el BOP, en su mayoría en la capa granular y en la región periglomerular, provienen principalmente del brazo horizontal del núcleo de la banda diagonal, el área preóptica lateral y el hipotálamo rostralateral, constituyendo un sistema de inervación colinérgica. Asimismo, también recibe aferencias del núcleo olfatorio anterior (bilateral), de la corteza piriforme anterior, el locus coeruleus y el rafé mesencefálico. Mientras que, las fibras centrifugas que recibe el BOA provienen de la amígdala corticomedia, el locus coeruleus, el núcleo del tracto olfatorio lateral y el rafé (Broadwell y Jacobowitz, 1976).

Un trabajo recientemente realizado por Oboti y cols. (2011), confirma que la supervivencia de las células granulares nuevas en el BOA depende de la actividad sensorial periférica y centrífuga, y que dicha actividad tiene su máximo efecto en la sobrevivencia de estas células cuando la estimulación se recibe entre los siete a catorce días de su nacimiento.

Tomando en cuenta estos antecedentes, nosotros proponemos que las estructuras centrales que se encargan de modular la ejecución de la conducta sexual, como la MePD, el VMH y el MPOA pueden regular la neurogénesis en el BO a través de

aferencias centrífugas actuando en conjunto con las aferencias sensoriales centrípetas durante la cópula regulada por la rata hembra adulta (Figura 4).

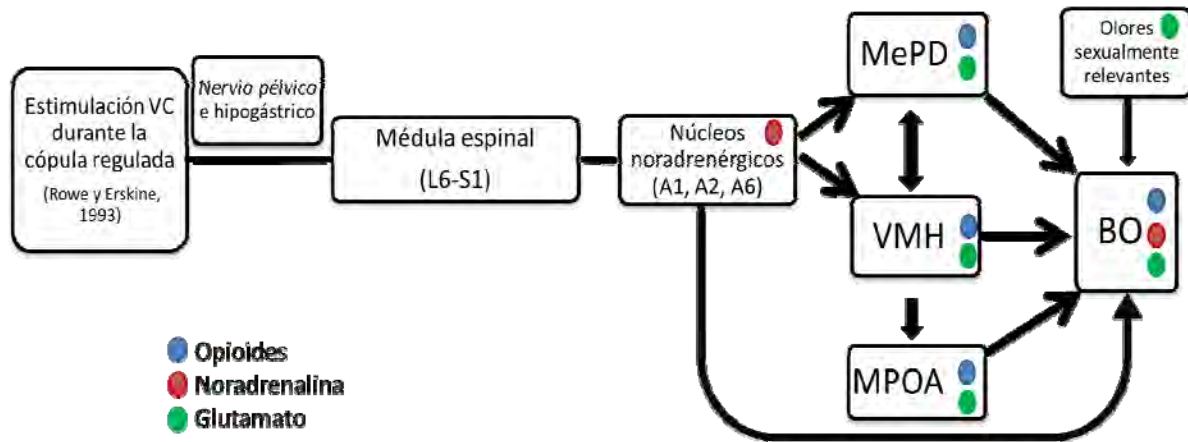


Figura 4. Diagrama de las posibles aferencias sensoriales centrípetas y aferencias centrífugas de estructuras centrales que pueden regular la neurogénesis promovida por la cópula regulada repetida en la rata hembra adulta. Amígdala medial posterodorsal (MePD), hipotálamo ventromedial (VMH), área preóptica medial (MPOA), locus coeruleus (A6) y bulbo olfatorio (BO).

CAPITULO 2

2.1 JUSTIFICACIÓN

La neurogénesis en el cerebro del mamífero adulto tiene lugar en dos nichos: la ZSG del hipocampo y la ZSV en la pared del ventrículo lateral. Ambos nichos generan interneuronas nuevas que se integran al giro dentado del hipocampo y al BO, respectivamente. Sin embargo, aún son poco conocidos los mecanismos que regulan la neurogénesis son poco conocidos, así como su relevancia fisiológica. Como ya se mencionó anteriormente, se ha propuesto que la neurogénesis que se observa en las principales poblaciones de interneuronas del BO, se desarrolla en función de las demandas ambientales y la estimulación periférica y central que el sistema recibe. Por ejemplo, existe evidencia que sugiere una necesidad fundamental de neuronas nuevas para la consolidación de la memoria a largo plazo en tareas olfativas, como estrategia adaptativa para el cuidado de las crías o como una estrategia reproductiva para el reconocimiento de pareja en el roedor. Nuestro grupo de investigación demostró que la primera experiencia sexual regulada incrementa el número de células nuevas en la capa celular interna del BOA de la rata hembra en comparación con grupos de ratas hembra que fueron expuestas a un macho sexualmente activo sin tener contacto sexual y aquellas que se sometieron a una sesión de cópula no regulada. Debido a la influencia que tiene la ejecución de la cópula regulada sobre la generación de células nuevas, en el presente trabajo se evaluó el efecto de la cópula regulada repetida sobre la sobrevivencia de las interneuronas nuevas en las diferentes capas del BOP y BOA, dieciséis días después del primer contacto sexual. Cabe mencionar que la repetición de la cópula regulada puede estimular la supervivencia e integración de las neuronas nuevas, ya que estudios previos han demostrado que existe un periodo crítico durante el cual la actividad sensorial, en este caso olfatoria y posiblemente, vaginocervical, fortalece dichas etapas del proceso neurogénico.

2.2 HIPÓTESIS

La cópula regulada y repetida incrementará el número de neuronas nuevas en el BO de la rata hembra generadas por el primer contacto sexual con respecto a grupos de hembra que no regulan ni repiten la cópula.

2.3 OBJETIVOS

1. Determinar el número de células nuevas generadas en el BO de la rata hembra después de dieciséis días de haber ocurrido el primer contacto sexual.
2. Evaluar el efecto de la estimulación sexual repetida sobre las neuronas nuevas generadas en el BO de la rata hembra, dieciséis días después de ocurrido el primer contacto sexual.
3. Comparar los niveles plasmáticos de progesterona y estradiol entre los diferentes grupos.

2.4 SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS

2.4.1 Sujetos

Se utilizaron ratas hembra sin experiencia sexual de la cepa *Wistar* (200- 250 g), las cuales fueron distribuidas aleatoriamente en cinco grupos (n=10). 1) Control: hembras ovariectomizadas (OVX) que no recibieron ningún estímulo sexual ; 2) hembras intactas ; 3) cópula regulada 1hr- 1 sesión: hembras OVX las cuales recibieron una sesión de contacto sexual en cópula regulada; 4) cópula regulada 1hr- 4 sesiones: hembras OVX las cuales fueron sometidas a cuatro sesiones de cópula regulada en un periodo de 16 días; y 5) cópula no regulada 1hr- 4 sesiones: hembras OVX las cuales fueron sometidas a contacto sexual no regulado en cuatro sesiones en un período de 16 días. Todas las hembras ovariectomizadas fueron inyectadas con BE (25 µg/kg) y P4 (1 mg/kg), 48 y 4 horas antes de la prueba, respectivamente, para inducirles receptividad sexual (Martínez y Paredes, 2001). Por otro lado, las hembras que se expusieron a contacto sexual repetido siempre copularon con el mismo macho para tratar de mantener una uniformidad en las claves olfatorias recibidas por la hembra, así como en la estimulación sexual. Los machos estímulo (300 – 350 g) de la cepa *Wistar* fueron entrenados durante tres pruebas de cópula y se seleccionaron aquellos que eyacularon en los primeros 30 min en todas las pruebas (sexualmente expertos, n= 30).

2.4.2 Administración del marcador de síntesis de ADN 5-bromo-2'- desoxiuridina (BrdU)

El día uno del experimento, a todas las hembras (excepto al grupo intacto) se les administró intraperitonealmente tres dosis de 100 mg/kg del marcador de síntesis de ADN (BrdU) diluido en solución salina fisiológica. Así, las inyecciones fueron realizadas: una hora antes de la prueba, al término de la prueba y una hora después de la prueba conductual correspondiente.

Las hembras del grupo control se colocaron en las cajas de cópula en donde no fueron expuestas a ningún estímulo los cuatro días de prueba (1, 6, 11 y 16). El grupo de cópula regulada recibió una sesión (CR 1h-1) el día 1, manteniéndose en su caja de alojamiento hasta el día 16 que fue sacrificado. Los grupos de cópula regulada y cópula no regulada se expusieron a contacto sexual con un mismo macho en los cuatro días de

prueba. En el caso del grupo intacto, se registró el ciclo estral de las hembras diariamente y se administró BrdU cuando se encontraban en la tarde del proestro, fase en la que se manifiesta la conducta de estro (ver Figura 5).

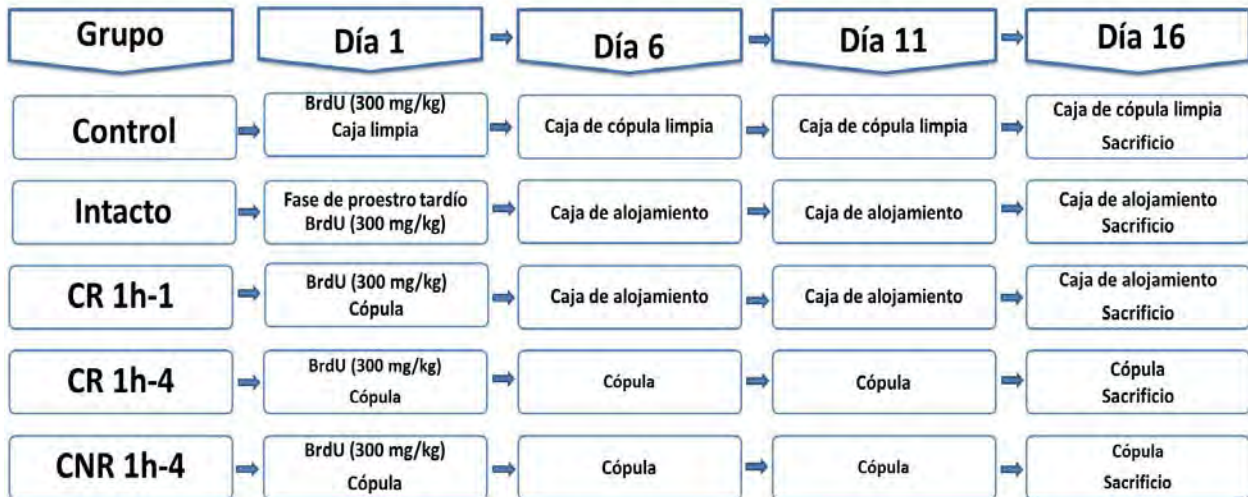


Figura 5. Diseño experimental que muestra la manipulación de los grupos control, cópula regulada durante una sesión (CR 1h-1), cópula regulada durante cuatro sesiones (CR 1h-4) y cópula no regulada durante cuatro sesiones (CNR 1h-4). El grupo intacto fue administrado con BrdU durante la fase de proestro tardío del ciclo estral de las hembras, n=10.

2.4.3 Seguimiento del ciclo estral del grupo intacto

Como se mencionó anteriormente, se realizó un seguimiento del ciclo estral del grupo intacto para la administración de BrdU en la fase de la tarde del proestro (ver Figura 6). Las diferentes fases del ciclo estral se pueden identificar por la morfología de las células de las paredes vaginales, para lo cual se obtienen frotis vaginales que se tiñen con azul de metileno al 10% y se observan al microscopio.

Un frotis vaginal realizado en la fase de diestro, se caracteriza por la presencia de gran cantidad de leucocitos, muy pocas células queratinizadas, y algunas células nucleadas. El frotis realizado en la fase de proestro presenta una gran cantidad de células epiteliales nucleadas y pocos leucocitos, en la tarde del proestro se pueden observar células queratinizadas que indican que la fase de estro está por iniciar. El frotis obtenido en la fase de estro se caracteriza por presentar abundantes células epiteliales cornificadas sin núcleo, pocas células nucleadas y ningún leucocito. El frotis de la fase de metaestro muestra una cantidad moderada de leucocitos y pocas células epiteliales queratinizadas (Allen, 1931).

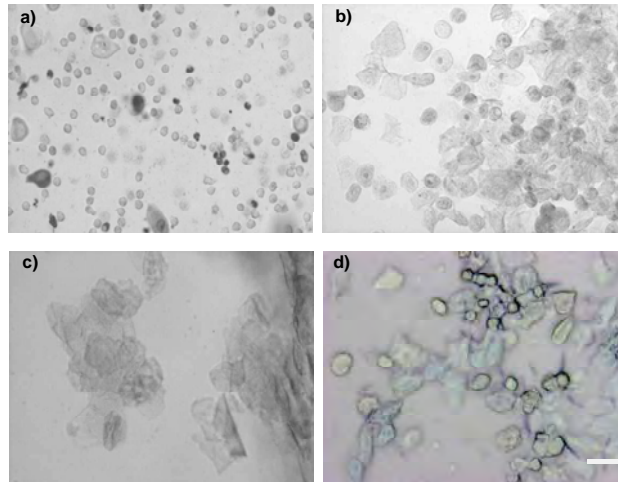


Figura 6. Micrografías de frotis vaginales de ratas hembra del grupo intacto tomados en las diferentes etapas del ciclo estral. a) Diestro, b) Proestro, c) Estro y d) Metaestro. Objetivo 20x y barra de calibración de 50 μ m.

2.4.4 Sesiones de conducta sexual

Los sujetos se sometieron a las pruebas de conducta sexual en cajas de acrílico transparente (40 cm x 60 cm x 40 cm). Para las pruebas de cópula regulada (Figura 7a), se colocó una barrera del mismo material con un orificio en la parte media de la base (4 cm de diámetro), para que, debido a su tamaño, sólo la hembra pudiera pasar de un compartimento a otro y fuera ella la que controlara la frecuencia de la estimulación sexual que recibiera del macho. En las pruebas de cópula no regulada (Figura 7b) se retiró la barrera para que el macho tuviera libre acceso y fuera él quien controlara la frecuencia de la estimulación sexual que recibiría la hembra.

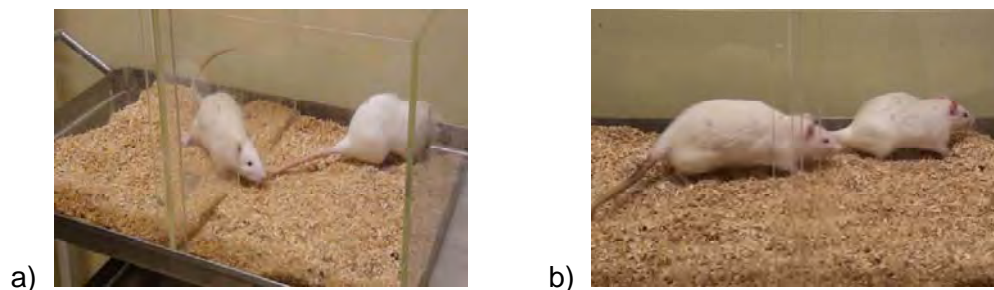


Figura 7. Fotografías de las cajas de cópula. a) Condición de cópula regulada (nótese la barrera de acrílico en el centro de la caja). La hembra pasa libremente de un compartimento a otro, y por tanto ella regula la cópula. b) Condición de cópula no regulada, en la cual el macho regula la interacción sexual.

Durante las sesiones de cópula se registraron los siguientes parámetros: número de montas, intromisiones y eyaculaciones. Latencia de monta, intromisión y de eyaculación, que se definen como el periodo en segundos que el macho tarda para realizar la primera estimulación sexual de cada tipo. La intensidad media de lordosis (IML) se define como el grado de dorsiflexión de la columna de la hembra (Figura 8) y se puede clasificar como: cero, cuando la hembra no ejecuta tal dorsiflexión; uno, cuando es de intensidad moderada y dos, cuando su intensidad es alta (clasificación adaptada de Hardy y DeBold, 1972). El coeficiente de lordosis (CL) se refiere al número total de respuestas de lordosis entre la suma del número de intromisiones y montas, multiplicado por 100. En el caso de las sesiones de cópula regulada se registraron también las salidas de la hembra del compartimento del macho después de recibir una monta o una intromisión. Así como, la latencia de regreso después de una monta (LRM) y la latencia de regreso después de una intromisión (LRI), es decir, el tiempo que tardó en regresar al compartimento del macho después de recibir una monta o intromisión, respectivamente. A partir de estos datos, se calculó el intervalo interintromisión (III), que resulta de dividir la latencia de eyaculación entre el número de intromisiones recibidas y los porcentajes de salidas después de monta (%SDM) y después de intromisión (%SDI).

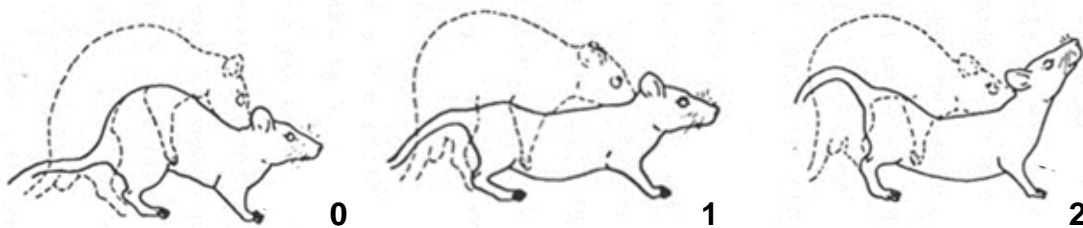


Figura 8. Esquema de los grados de lordosis en la hembra ante la monta del macho. Nótese la dorsiflexión del dorso de la hembra (adaptada de Hardy y DeBold, 1972).

2.4.5 Sacrificio de los animales

Al concluir el periodo de 16 días después de la administración de BrdU y 90 min después de la última prueba conductual, los animales recibieron una sobredosis de anestesia (pentobarbital) y fueron perfundidos intracardiamente con solución salina seguida de paraformaldehído al 4%. Inmediatamente antes de la perfusión, se

obtuvieron 1.5 mL de sangre por punción cardiaca, a las cuales se adicionó de tres gotas de heparina al 10%. Posteriormente, se extrajo el cerebro y se mantuvo durante una hora en una solución de paraformaldehído y, posteriormente, se almacenó en una solución de sacarosa al 30% hasta su utilización.

Las muestras sanguíneas fueron centrifugadas a 2,500 rpm durante 15 minutos. Posteriormente, se recolectó el plasma sanguíneo y se almacenó a -80°C para realizar la cuantificación de la progesterona y el estradiol.

2.4.6 Inmunohistoquímica contra BrdU

Los cerebros fueron cortados en un criostato obteniendo series de cortes sagitales de 30 μ m del hemisferio derecho. Una serie fue procesada mediante inmunohistoquímica por flotación para la detección de células inmunorreactivas a BrdU (ir-BrdU) en el BOA y BOP.

El procedimiento general para realizar la inmunodetección de BrdU se basa en el descrito por Corona y cols., 2011. Se seleccionaron seis cortes histológicos por sujeto, los cuales fueron incubados con ácido clorhídrico 2N durante una hora a 37°C para desnaturalizar el ADN. Posteriormente, se incubaron en una solución de borohidrato de sodio al 0.5% durante 15 min para neutralizar el ácido. Para reducir la inmunodetección inespecífica los cortes fueron bloqueados con una solución de albúmina (Sigma) al 0.01% y Tritón X-100 (J.T.Baker) al 0.03%. El anticuerpo primario Anti-BrdU de ratón (BD Biosciences) fue utilizado a una concentración 1:2000 en una solución de albúmina al 0.01% y Tritón X-100 (0.032%), los cortes fueron incubados al menos 16 horas a 4°C. Posteriormente, los cortes fueron incubados con el anticuerpo secundario biotinilado Anti-IgG ratón (Vector) el cual fue diluido a una concentración 1:500 en una solución de albúmina al 0.01% y Tritón X-100 (0.032%), y la incubación se realizó por 2 horas a temperatura ambiente. Para la detección se empleó un kit de avidina- biotina- peroxidasa (Vectastain) y el revelado se realizó con una solución de diaminobenzidina al 0.6%, peróxido de hidrógeno (0.072%) y níquel (10%). Cabe mencionar que se incluyeron cortes de tejidos con presencia del antígeno (BrdU) como controles positivos y controles negativos sin presencia del antígeno para verificar la especificidad del anticuerpo primario. Así como tejidos con el antígeno sin adición de anticuerpo primario

como controles negativos para verificar la especificidad del anticuerpo secundario. De esta manera se comprobó la ausencia de uniones inespecíficas de ambos anticuerpos.

2.4.7 Conteo de células inmunorreactivas a BrdU

Para identificar las tres capas celulares del BOA y BOP en las que se efectuaría el conteo de las células inmunorreactivas a BrdU, se realizó una tinción de Nissl sobre una serie de cortes sagitales de 30 μm de espesor. A partir de estos cortes histológicos se realizaron reconstrucciones microscópicas del BO completo con un objetivo 4x en un microscopio Olympus BX60. La capa glomerular en ambos casos es la más apical y se identifica por la presencia de estructuras de neuropilo, denominadas glomérulos; por debajo de dicha capa se encuentran las células mitrales y empenachadas que se observan como una línea delgada fuertemente teñida, denominada capa mitral en el BOP y CCE en el BOA; y finalmente, las células granulares que se encuentran en la capa más interna y abundante, denominada capa granular en el BOP y CCI en el BOA (ver Figura 9).

Una vez identificadas las capas, se colocaron tres círculos con un diámetro de 400 μm en la región anterodorsal del BOP por cada capa y tres círculos con un diámetro de 200 μm en el BOA por cada capa, de manera similar al método descrito por Corona y cols., (2011). En cuanto al BOP, se seleccionó dicha área porque en un estudio previo de Keller y cols., (2006b) no se encontraron diferencias en la expresión de la proteína Fos, un marcador de activación temprana, entre la región dorsal y ventral.

Con ayuda del programa ImagePro se cuantificó automáticamente el número de células BrdU-ir con base a la densidad óptica y tamaño de la marca, lo cual fue ajustado con los controles positivos. Cabe mencionar que se cuantificaron de cuatro a seis cortes sagitales con BOP y BOA por sujeto. Mientras que el número de sujetos por grupo fue de siete, los cuales fueron seleccionados aleatoriamente. Posteriormente, se realizó el cálculo del número de células nuevas por unidad de área en milímetros cuadrados por corte.

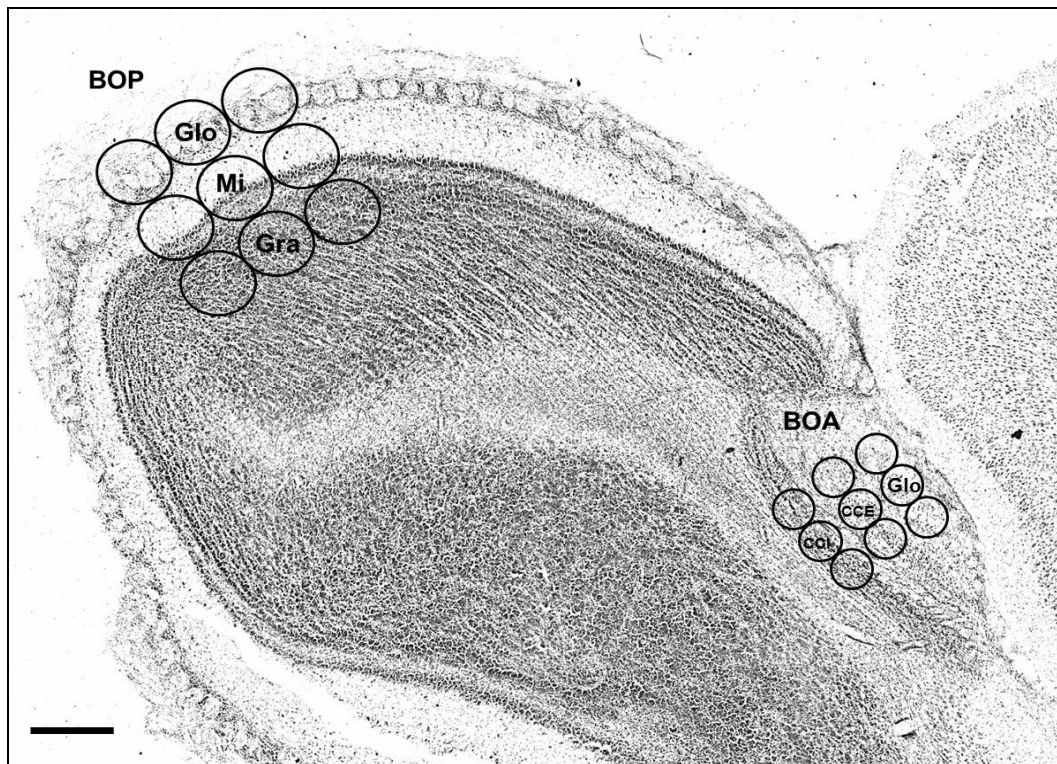


Figura 9. Corte sagital de bulbo olfatorio de ratona hembra con tinción de Nissl. En la micrografía (4x) se muestran las áreas en las que se cuantificaron células ir- BrdU en cada una de las capas glomerular (Glo), mitral (Mi) y granular (Gra) del BOP y glomerular (Glo), celular externa (CCE) y celular interna (CCI) del BOA. Barra de calibración de 500µm.

2.4.8 Inmunofluorescencia para la detección de células BrdU/NeuN positivas

Para determinar el número de células nuevas que se diferencian a neuronas, se realizó un marcaje doble con BrdU y NeuN (núcleo neuronal) en el BOA y BOP utilizando otra serie de cortes de 30µm. NeuN es una proteína nuclear específica de las neuronas y es expresada por la mayoría de los tipos celulares neuronales presentes en el sistema nervioso central de vertebrados (Mullen y cols., 1992).

El procedimiento general para realizar el marcaje doble es similar al descrito por Corona y cols., 2011. Los cortes histológicos fueron incubados con ácido clorhídrico 2N durante una hora a 37°C para desnaturalizar el ADN. Posteriormente, se incubaron en una solución de borohidruro de sodio al 0.5% durante 15 min para neutralizar el ácido. Para reducir la inmunodetección inespecífica los cortes fueron bloqueados con una

solución de albúmina al 0.01% y Tritón X-100 (0.03%). El anticuerpo primario Anti-BrdU de rata (BD Biosciences) fue utilizado a una concentración 1:800, mientras que el anticuerpo primario Anti-NeuN de ratón (Invitrogen) fue utilizado a una concentración 1:250 en una solución de albúmina al 0.01% y Tritón X-100 (0.032%), los cortes fueron incubados al menos 16 horas a 4°C. Posteriormente, los anticuerpos secundarios Anti-IgG rata Alexa Fluor 488 y Anti-IgG ratón Alexa Fluor 568 (Invitrogen) fueron diluidos a una concentración 1:1250 en una solución de albúmina al 0.01% y Tritón X-100 (0.032%), y la incubación se realizó por 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se montaron los cortes en laminillas y se cubrieron con ayuda del medio de montaje Aqua Poly/Mount (Polysciences, Inc.).

En este ensayo también se incluyeron controles positivos y controles negativos para verificar la especificidad del marcaje. De esta manera se comprobó la ausencia de uniones inespecíficas de ambos anticuerpos.

2.4.9 Conteo de células inmunorreactivas BrdU/NeuN

Dado que sólo se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en la capa granular del BOP y la CCI del BOA se evaluó el número de células doblemente marcadas con BrdU y NeuN en estas regiones. A partir de tres cortes diferentes de 30µm, se obtuvieron tres micrografías en la capa granular del BOP (n=3) y dos micrografías diferentes en la CCI del BOA (n=4). Se redujo el número de animales en cada grupo debido a lo detallado del análisis y a que la variabilidad en los resultados del número de células inmunorreactivas a BrdU entre sujetos no fue grande. Las fotos fueron tomadas con el objetivo 20x de un microscopio confocal Zeiss LSM 510 (Figura 10). El conteo se realizó manualmente con ayuda del software Zeiss LSM Image Examiner y se confirmó el doble marcaje de cada célula con la vista ortogonal (ver Apéndice C).

Posteriormente, se realizó el cálculo del número de células doblemente marcadas por unidad de área en milímetros cuadrados por corte.

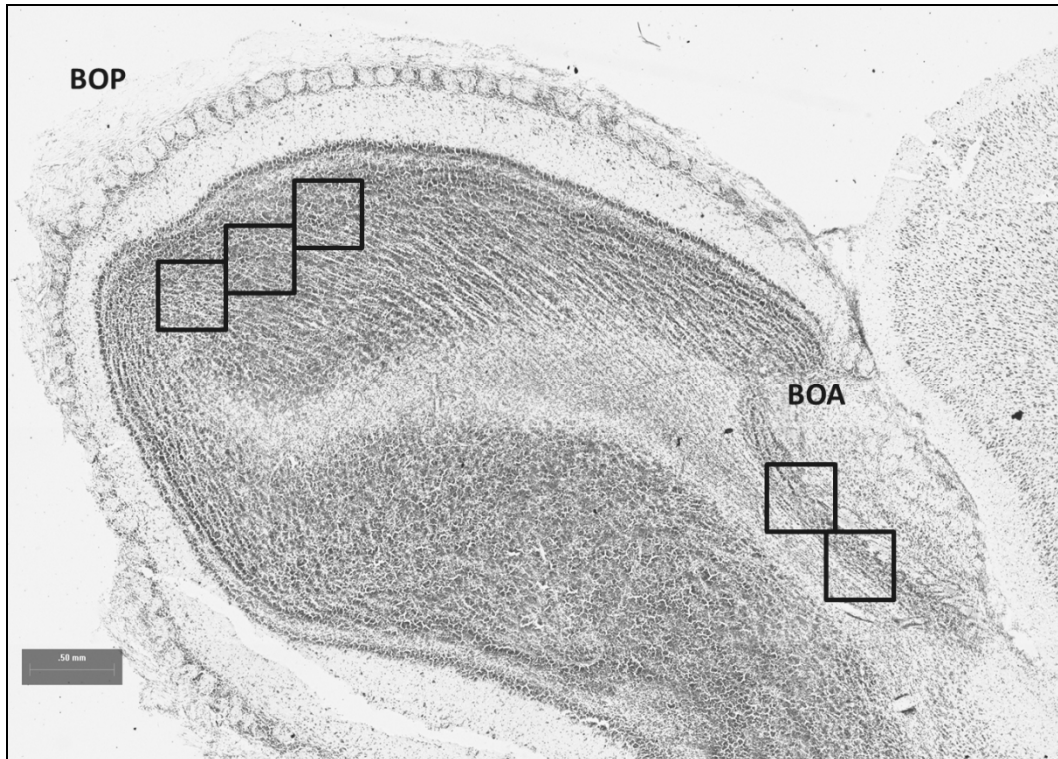


Figura 10. Corte sagital de bulbo olfatorio de rata hembra con tinción de Nissl. En la micrografía (4x) se muestran las áreas en las que se cuantificaron células ir- BrdU/NeuN en la capa granular del BOP y celular interna del BOA. Barra de calibración de 500μm.

2.4.10 Cuantificación de la concentración plasmática de estradiol (E2) y progesterona (P4)

La cuantificación de ambas hormonas se realizó con un equipo de inmunoensayo para la determinación en suero o plasma (EIA) de la marca Diagnóstica Internacional. Se eligieron al azar cinco sujetos por grupo.

La prueba está basada en el principio de adherencia competitiva entre la hormona (E2 o P4) en el espécimen de prueba y el conjugado de hormona-peroxidasa de rábano (HRP) para una cantidad constante de un anticuerpo anti-estradiol de conejo. En la incubación, los pozos revestidos de IgG de cabra anti-conejo son incubados con 25 μl de estándares de la hormona, controles y muestras problema, 100 μl de reactivo de conjugado hormona-HRP y 50 μl de reactivo anti-E2 o anti-P4 de conejo a 37°C por 90 minutos. Durante la incubación, una cantidad constante de hormona etiquetada con HRP compete con la hormona endógena en la muestra por un número fijo de sitios de adherencia del anticuerpo. Así, la cantidad de conjugado de peroxidasa-hormona

inmunológicamente adherida al pozo disminuye progresivamente conforme aumenta la concentración de hormona en la muestra.

El conjugado de hormona-HRP no adherido se lava cinco veces con agua destilada. Después, una solución de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) se agrega e incuba a temperatura ambiente por 20 minutos y la solución se torna color azul. El cambio de color se detiene con la adición de HCl 1N, y la absorbancia se mide con un espectrofotómetro a 450 nm. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de enzima presente y está inversamente relacionada con la cantidad de hormona no etiquetada en la muestra.

La concentración de hormona en las muestras se calcula a partir de una curva estándar trazada con los valores de los estándares proporcionados en el estuche comercial.

2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos en las pruebas de conducta sexual y de la cuantificación de células ir- BrdU fueron sometidos a pruebas de homogeneidad de varianza (Levene) y de normalidad (Shapiro- Wilk) para determinar si los datos tenían una distribución normal, lo cual se cumplió en todos los análisis.

Los datos de los parámetros de conducta sexual (Tabla I) comunes a los tres grupos de cópula fueron analizados empleando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. En caso de encontrar diferencias significativas entre los grupos se realizó la prueba *post hoc* de Tukey. Para los parámetros determinados únicamente en los grupos de cópula regulada, los datos también mostraron una distribución normal y fueron analizados con una *t* de student. Adicionalmente, se hizo una comparación entre los datos promedio de los dos grupos de cuatro sesiones de cópula repetida con una prueba *t* de student (Tabla II).

Por otro lado, los datos de la cuantificación de células ir- BrdU y células ir-BrdU y NeuN fueron analizados con un ANOVA de una vía. Se realizó la comparación entre los cinco grupos por cada una de las tres capas del BOA y BOP, y para los datos del doble marcaje la comparación se realizó únicamente con los datos de la capa granular y de la CCI. En caso de diferencias significativas se utilizó la prueba *post hoc* de Tukey.

Asimismo, los datos de la cuantificación de E2 y P4 fueron analizados con un ANOVA de una vía comparando los grupos que recibieron el mismo tratamiento hormonal, es decir, el grupo control, el grupo de cópula regulada 1hr- 4 sesiones y el grupo de cópula no regulada 1hr- 4 sesiones, así como el grupo intacto. El grupo de una sola sesión de cópula regulada (CR 1h-1) fue excluido porque sólo recibió una administración hormonal el día que copuló (día 1). En caso de diferencias significativas se utilizó la prueba *post hoc* de Tukey.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS

3.1 PARÁMETROS DE CONDUCTA SEXUAL

Los datos obtenidos en las pruebas de conducta sexual (Tabla I) muestran diferencias estadísticamente significativas en el número de montas ($F_{(2,29)} = 7.572$, $p=0.002$), el número de intromisiones ($F_{(2,29)} = 34.452$, $p<0.001$), el número de eyaculaciones ($F_{(2,29)} = 4.860$, $p=0.016$), la latencia de monta ($F_{(2,29)} = 6.508$, $p=0.005$), la latencia de intromisión ($F_{(2,29)} = 3.988$, $p=0.03$) y el intervalo interintromisión ($F_{(2,29)} = 4.578$, $p=0.019$) entre el grupo de una sola sesión de cópula regulada (CR 1h-1) y el grupo de cópula repetida no regulada (CNR 1h-4). Asimismo, encontramos diferencias significativas en el número de intromisiones ($p=0.047$) y en la latencia de monta ($p=0.016$) entre los grupos CR 1h-1 y cópula repetida regulada (CR 1h-4). Estos resultados sugieren una mejoría en el desempeño sexual de los machos y las hembras con entrenamiento continuo en condiciones de cópula regulada.

Por otro lado, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos CNR 1h-4 y CR 1h-4 en dos parámetros: el intervalo interintromisión (III), siendo más alto ($p=0.03$) y el número de intromisiones más bajo ($p<0.001$) en el grupo de cópula regulada en comparación con el grupo de cópula no regulada. Estos resultados concuerdan con reportes previos (Erskine y cols., 1989; Krieger y cols., 1976; Peirce y Nuttall, 1961).

Tabla I. Parámetros de conducta sexual registrados durante la única sesión o las cuatro sesiones de cópula según corresponda. Los datos se expresan como el promedio \pm el error estándar (e.e).

Parámetros de conducta sexual	Grupos de cópula regulada por una hora (n=10)		Grupo de cópula no regulada por una hora (n=10)
	Una sesión (CR 1h-1)	Cuatro sesiones (CR 1h-4)	Cuatro sesiones (CNR 1h-4)
# Montas	12.3 \pm 2.55	22.8 \pm 2.32	29.9 \pm 4.4*
# Intromisiones	22.3 \pm 1.57	29.07 \pm 2.03*	44.22 \pm 2.08 ^{***}
# Eyaculaciones	2.6 \pm 0.26	3 \pm 0.15	3.52 \pm 0.19*
Latencia de monta (s)	110.1 \pm 16.67	52.2 \pm 13.72*	47.57 \pm 9.64*
Latencia de intromisión (s)	132.4 \pm 20.59	95.62 \pm 22.73	56.72 \pm 11.68*
Latencia de eyacuación (s)	772.7 \pm 84.38	716.3 \pm 81.97	707.1 \pm 85.3
III (s)	81.11 \pm 10.77	78.81 \pm 9.23	48.13 \pm 4.57 ^{+,*}
IML	1.75 \pm 0.05	1.77 \pm 0.03	1.83 \pm 0.05
CL	100.0 \pm 0	99.89 \pm 0.24	99.75 \pm 0.78
LRM (s)	37.99 \pm 9.14	22.42 \pm 2.39	
LRI (s)	82.27 \pm 27.11	43.07 \pm 2.5	
%SDM	56.36 \pm 9.6	42.85 \pm 4.64	
%SDI	63.93 \pm 6.81	68.77 \pm 4.94	

Diferente del grupo una sesión regulada repetida (CR 1h-1): * (p<0.05); ** (p<0.01)
Diferente del grupo cópula regulada repetida (CR 1h-4): + (p<0.05); ++ (p<0.01)

3.2 CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS BrdU POSITIVAS

En las Figuras 11 y 12 se muestra el promedio \pm el error estándar por grupo del número de células inmunorreactivas a BrdU por milímetro cuadrado. En la sección de Apéndices se muestran las micrografías de los cortes histológicos.

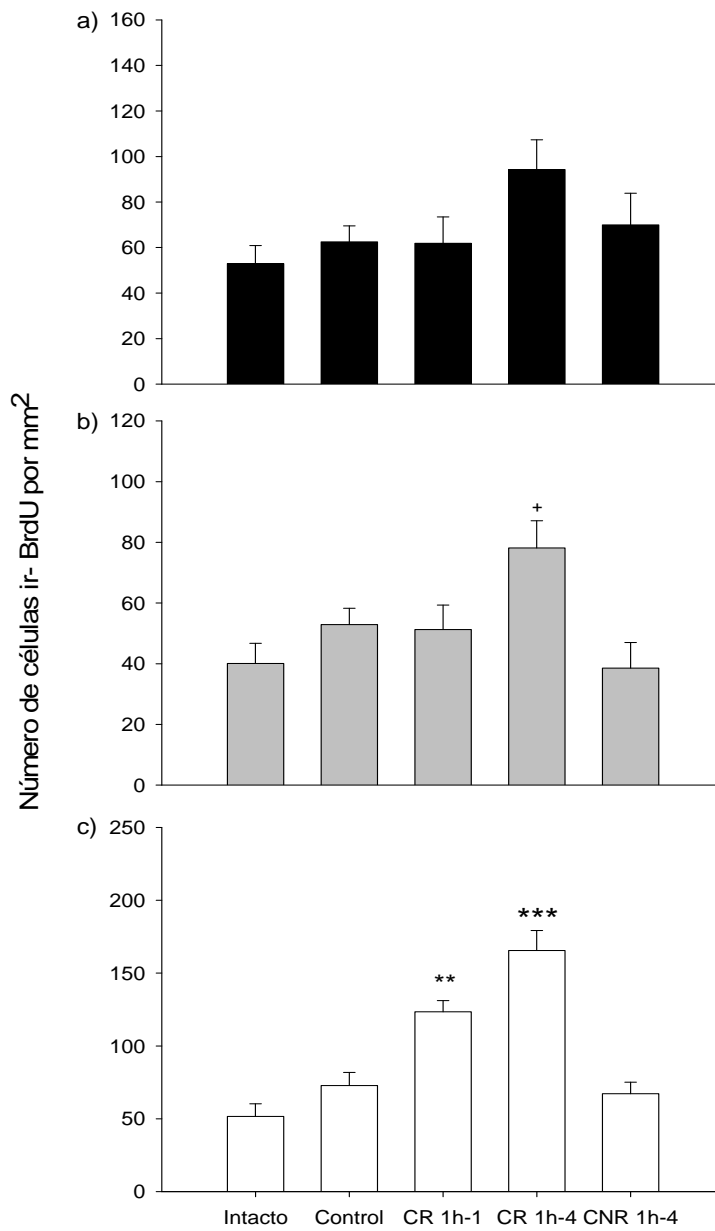
3.2.1 Bulbo olfatorio accesorio

De las tres capas del BOA, el ANOVA demostró diferencias estadísticamente significativas en la CCE ($F_{(4,34)} = 4.339$, $p = 0.007$). La prueba *post-hoc* de Tukey mostró que el número de células BrdU positivas es mayor en el grupo de cuatro sesiones de cópula regulada durante una hora (CR 1h-4) con respecto al grupo intacto y al grupo de cuatro sesiones de cópula no regulada durante una hora (CNR 1h-4). Además, el ANOVA reveló diferencias significativas en la CCI ($F_{(4,34)} = 24.094$, $p < 0.001$). La

prueba de Tukey mostró que el grupo CR 1h-4 presenta un mayor número de células BrdU positivas con respecto a todos los grupos y el grupo CR 1h-1 con respecto al grupo control (ver Figura 11). En la capa glomerular (Glo) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($F_{(4,34)} = 2.009$, $p = 0.119$).

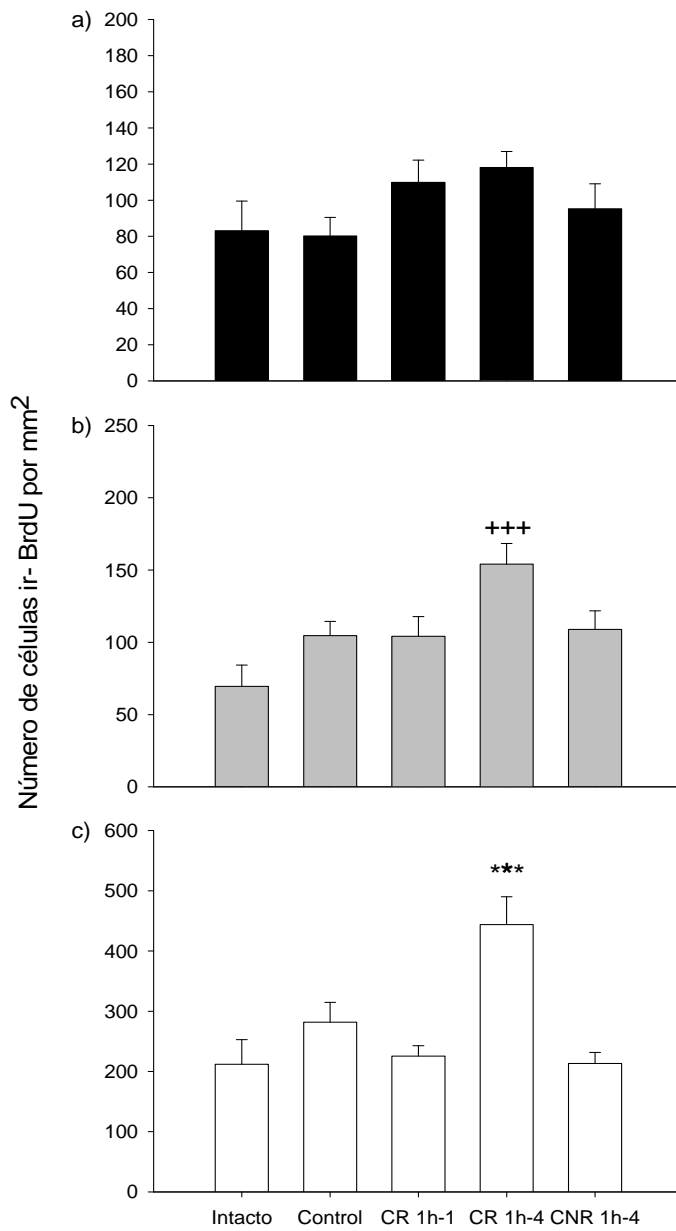
3.2.2 Bulbo olfatorio principal

En el BOP, el ANOVA reveló diferencias estadísticamente significativas en la capa de células mitrales (Mi), ($F_{(4,34)} = 5.254$, $p = 0.002$), la prueba *post-hoc* de Tukey mostró que el número de células BrdU positivas es mayor en el grupo CR 1h-4 con respecto al grupo intacto. Asimismo, con el ANOVA se encontraron diferencias significativas en la capa de células granulares (Gra), ($F_{(4,34)} = 8.769$, $p < 0.001$), la prueba de Tukey mostró que el grupo CR 1h-4 presenta un mayor número de células BrdU positivas con respecto a todos los grupos (ver Figura 12). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la capa Glo ($F_{(4,34)} = 1.713$, $p = 0.173$).



Diferente de todos los grupos: ** (p<0.01)*** (p<0.001)
 Diferente del grupo intacto: + (p<0.05)

Figura 11. Número de células BrdU inmunorreactivas por grupo (n=7) en la capa glomerular (a), capa celular externa (b) y capa celular interna (c) del BOA.



Diferente del grupo intacto: +++ (p<0.001)
 Diferente de todos los grupos: *** (p<0.001)

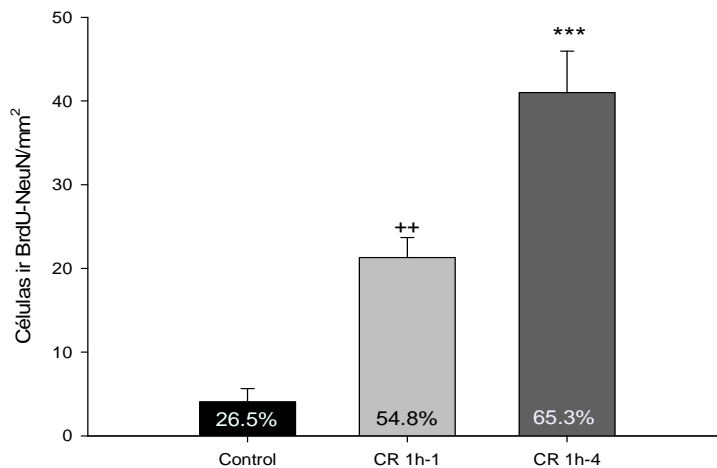
Figura 12. Número de células BrdU inmunorreactivas por grupo (n=7) en la capa glomerular (a), capa mitral (b) y capa granular (c) del BOP.

3.3 CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS BrdU/NeuN POSITIVAS

Con base en los resultados obtenidos en la cuantificación de células nuevas en los diferentes grupos, se realizó el conteo de células doblemente marcadas con BrdU y NeuN en los grupos: control, cópula regulada 1h-1 y cópula regulada 1h-4, ya que en estos grupos se encontraron diferencias significativas.

3.3.1 Capa celular interna del BOA

La cuantificación de células doblemente marcadas con BrdU y NeuN se realizó en la CCI del BOA porque fue en esta capa donde se encontró una diferencia significativa en el número de células nuevas con respecto al control. En este sentido, el ANOVA entre los tres grupos arrojó diferencias significativas, ($F_{(2,11)} = 31.44$, $p < 0.001$), la prueba *post-hoc* de Tukey mostró que el número de células doblemente marcadas con BrdU y NeuN (Figura 13) es mayor en ambos grupos de cópula regulada con respecto al control, y que el grupo de cuatro sesiones de cópula regulada (CR 1h-4) presenta un número mayor de estas células con respecto al grupo de una sola sesión regulada (CR 1h-1).



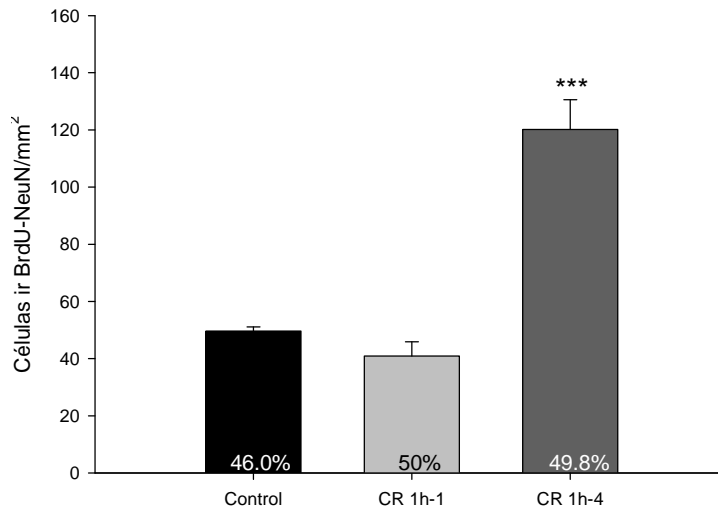
Diferente del grupo control: ++ ($p < 0.01$)

Diferente de todos los grupos: *** ($p < 0.001$)

Figura 13. Número de células doblemente marcadas con BrdU/NeuN en la capa celular interna del BOA. Los números dentro de las columnas representan el porcentaje de células doblemente marcadas con BrdU/NeuN con respecto a las inmunorreactivas sólo para BrdU, $n=4$.

3.3.2 Capa granular del BOP

De la misma manera que en la CCI del BOA, se realizó el conteo de células doblemente marcadas con BrdU y NeuN en la capa granular, ya que en esta capa se encontró una diferencia significativa en el número de células nuevas con respecto al control. En este caso, también el ANOVA demostró diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos, ($F_{(2,8)} = 41.647$, $p < 0.001$), y la prueba *post-hoc* de Tukey mostró que el número de células BrdU-NeuN positivas es mayor en el grupo CR 1h-4 con respecto al grupo control y al grupo de CR 1h-1. No mostrando diferencias este último grupo con respecto al control (Figura 14).



Diferente de todos los grupos: *** ($p < 0.001$)

Figura 14. Número de células doblemente marcadas con BrdU/NeuN en la capa granular del BOP. Los números dentro de las columnas representan el porcentaje de células doblemente marcadas con BrdU/NeuN con respecto a las inmunorreactivas sólo para BrdU, $n = 3$.

En cuanto a la proporción de células nuevas (marcadas con BrdU) con respecto al número de neuronas nuevas (marcadas con BrdU y NeuN), se realizó un análisis de chi-cuadrada y se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la CCI del BOA ($\chi^2_{(2)} = 31.052$, $p < 0.001$) en ambos grupos de cópula regulada contra el grupo control (Tabla II).

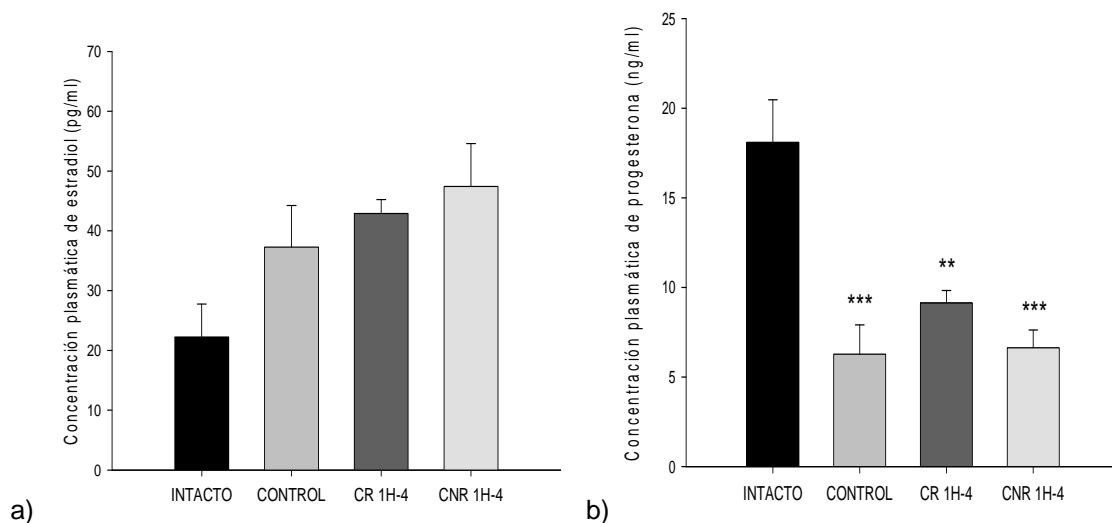
Tabla II. Porcentaje de células doblemente marcadas BrdU/NeuN (neuronas nuevas) con respecto al número de células marcadas con BrdU (células nuevas) en la CCI del BOA y la capa granular del BOP.

% Células ir BrdU/NeuN		
Grupo	CCI (BOA)	Gra (BOP)
Control	26.5	46.0
CR 1h-1	54.8 ***	50.0
CR 1h-4	65.3 ***	49.8

*** Estadísticamente diferente del grupo control: $p < 0.001$ (análisis X^2 cuadrada)

3.4 CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE ESTRADIOL Y PROGESTERONA

Los datos de la concentración de E2 plasmático no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($F_{(3,18)} = 3.171$, $p = 0.055$), entre los grupos analizados (ver Figura 15a). En cuanto a la concentración plasmática de P4 se observaron diferencias significativas entre los grupos ($F_{(3,19)} = 12.451$, $p < 0.001$). La prueba *post-hoc* de Tukey mostró que los tres grupos suplementados con progesterona tienen concentraciones plasmáticas más bajas que el grupo intacto ciclado en la etapa de proestro tardío. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos suplementados con hormonas (ver Figura 15b).



Diferente del grupo intacto: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Figura 15. a) Concentración plasmática de estradiol en pg/ml; b) Concentración plasmática de progesterona en ng/ml, $n = 5$.

CAPÍTULO 4

4.1 DISCUSIÓN

Los datos mostraron que las hembras que regulan la interacción sexual durante una sola sesión de cópula y que no tuvieron ningún tipo de contacto posterior con el macho, tienen un mayor número de células nuevas en la CCI del BOA en comparación con el grupo intacto y control, lo cual confirma nuestros resultados previos (Corona y cols., 2011). Por otro lado, encontramos un incremento en el número de células inmunorreactivas a BrdU, y más aún, en el número de neuronas nuevas en la CCI del BOA en el grupo de hembras que reguló la cópula en cuatro sesiones con respecto a los otros grupos, confirmando la hipótesis planteada en este trabajo. Además, encontramos un incremento en el número de neuronas nuevas en la capa granular del BOP en el grupo de hembras que reguló la cópula en cuatro sesiones con respecto a los demás grupos.

En cuanto a la proporción de neuronas nuevas en función del número total de células nuevas, se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la CCI del BOA en ambos grupos de hembras que regularon la cópula con respecto al grupo control. Estos resultados sugieren que, en la rata hembra, el estímulo recibido durante la cópula regulada define el destino de las nuevas células hacia el linaje neuronal, principalmente, y que éste no es modificado por la repetición de la conducta. Es decir, que la primera sesión de cópula regulada define el fenotipo celular, ya que se ha descrito que otras condiciones, como una lesión desmielinizante, pueden modificar el destino celular de las células precursoras a oligodendrocitos (González-Pérez y Alvarez-Buylla, 2011). Mientras que, las sesiones posteriores promueven la sobrevivencia de estas neuronas nuevas, ya que se observa un incremento en las neuronas cuantificadas después de cuatro sesiones con respecto a una sola sesión de cópula regulada. Sin embargo, éste efecto sólo se observó en el BOA, posiblemente debido a que esta estructura tiene mayor relevancia en la detección de claves sexualmente relevantes y en la ejecución de la conducta sexual (Martel y Baum, 2007; Martínez-Ricós y cols., 2008). Este argumento concuerda con los estudios de Oboti y cols. (2011) quienes reportaron, por medio del marcador de activación temprana c-fos,

una integración funcional de neuronas granulares de 2-3 semanas de edad del BOA relacionada con la detección de olores de macho. Mientras que la participación de las neuronas granulares del BOP no ocurrió sino hasta las seis semanas de edad. Esto sugiere también una maduración más rápida de las nuevas neuronas granulares del BOA en comparación con las del BOP. Lo anterior concuerda con nuestros datos ya que encontramos menos células BrdU/NeuN inmunorreactivas con respecto a las inmunorreactivas a BrdU en el BOP.

Por otro lado, encontramos diferencias estadísticamente significativas en el número de células nuevas en la CCE del BOA en el grupo de cópula regulada repetida con respecto al grupo intacto. De manera similar, encontramos un incremento en el número de células nuevas en la capa mitral del BOP en el grupo de cópula regulada repetida con respecto al grupo intacto. El principal tipo celular que se encuentra en ambas capas es de neuronas de proyección, las mitrales y las empenachadas. Nuestro hallazgo se puede deber a que las células nuevas observadas en estas capas se encuentran en migración hacia la capa glomerular, ya que de acuerdo a la clasificación realizada por Petreanu y Alvarez-Buylla (2002) en el ratón, las células granulares dejan de migrar alrededor de 15 días después de su nacimiento. Mientras que, debido a la ubicación de la capa glomerular es posible que les tome más tiempo a las nuevas neuronas periglomerulares arribar a su destino final. La posibilidad de que se traten de nuevas neuronas de proyección no la consideramos, ya que hasta el momento no se tiene conocimiento de que éste tipo de neuronas del bulbo olfatorio sean generadas en el animal adulto, sino únicamente durante el desarrollo embrionario (Blanchart y cols., 2006).

La ejecución de la conducta sexual en la rata hembra tiene su sustrato biológico en estructuras subcorticales como la amígdala (AMYG), el hipotálamo ventromedial (VMH), el área preóptica medial (MPOA) y el núcleo lecho de la estría terminal (BNST). En específico, se ha demostrado que la amígdala medial posterodorsal (MePD) actúa como un sensor de la frecuencia y cantidad de estimulación vaginocervical que la hembra recibe durante la cópula (Rowe y Erskine, 1993). Este núcleo se encuentra conectado con el VMH y el MPOA, áreas responsables de los mecanismos fisiológicos involucrados en la inducción y mantenimiento de la preñez. Se ha reportado que en

condiciones donde la hembra regula la cópula se obtiene un mayor éxito reproductivo. Esta condición se observa en ambientes seminaturales (McClintock y Anisko, 1982) y tiene una serie de consecuencias fisiológicas y conductuales como, la facilitación de la preñez y el acortamiento del estro (Erskine y Baum, 1982; Erskine y cols., 1989), así como, la inducción de un estado afectivo positivo en la rata hembra (Agmo y Berenfeld, 1990; Arzate y cols., 2011; Martínez y Paredes, 2001).

Estudios previos de nuestro grupo de investigación han demostrado que la ejecución de la conducta sexual regulada por la rata hembra (Corona y cols., 2011), la exposición repetida a feromonas de un macho dominante en el ratón hembra (Mak y cols., 2003) y el reconocimiento de pareja en el ratón hembra después de la cópula (Oboti y cols., 2011), estimulan la neurogénesis en el bulbo olfatorio. Posiblemente, debido a la formación de una memoria olfativa (Kermen y cols., 2010).

Sin embargo, se ha demostrado que la simple estimulación odorífera novedosa no tiene la capacidad de inducir la sobrevivencia de las neuronas nuevas a menos que la exposición sea repetida o se relacionen con tareas de aprendizaje olfatorio asociativo que involucran la participación de otras áreas corticales (Lazarini y Lledo, 2011). En nuestro trabajo, no observamos un incremento en el número de células nuevas en el grupo de hembras que en cuatro sesiones no reguló la cópula, por lo que, la exposición repetida a los olores sexualmente relevantes del macho no explican nuestros resultados.

Por otro lado, varios estudios han reportado la existencia de un periodo crítico en la vida de las neuronas nuevas que determinará si sobreviven o son eliminadas, el cual tiene lugar en el BOP entre la segunda y cuarta semana de nacimiento (Yamaguchi y Mori, 2005), y en el BOA desde la primera hasta la segunda semana de nacimiento (Oboti y cols., 2011). La sobrevivencia de las neuronas depende en gran medida de su activación, ya sea a través de contactos establecidos con el circuito local o con fibras centrífugas provenientes de diversas estructuras cerebrales (Whitman y Greer, 2007). Sí las estructuras que controlan la ejecución de la conducta sexual y proyectan aferencias centrífugas al BO, se activan diferencialmente durante la cópula regulada pueden estar activando a su vez a las nuevas neuronas promoviendo su sobrevivencia

y posiblemente su integración al circuito bulbar. Esto podría explicar porqué nuestro grupo de hembras expuestas a estimulación sexual regulada y repetida, durante las dos semanas posteriores al nacimiento de las células nuevas, muestran una mayor sobrevivencia celular en la capa granular del BOP y en la capa celular interna del BOA con respecto a los demás grupos, especialmente, en comparación con el grupo de hembras que reguló la cópula en una sola sesión y no recibió ningún tipo de estimulación posterior.

Algunos autores han sugerido que las aferencias centrífugas hacia el bulbo olfatorio influyen en el procesamiento de la información de manera precisa y funcional preparando al bulbo olfatorio para retos conductuales específicos (Mouret y cols., 2009). Este tipo de fibras son las primeras en hacer contacto sináptico con las neuronas nuevas, incluso antes que las propias neuronas del circuito bulbar, como las neuronas mitrales y empenachadas (Nissant y Pallotto, 2011). Entre las estructuras que envían aferentes centrífugas al BO se encuentran algunas que durante la cópula regulada se activan diferencialmente como son: el hipotálamo (De Olmos y cols., 1978) y la amígdala (Martínez-Marcos y Halpern, 1999) que envían aferentes centrífugas a las capas granular y glomerular del bulbo olfatorio y el locus coeruleus (Shipley y cols., 1985) cuyas fibras noradrenérgicas contactan la capa granular, la capa plexiforme interna y la capa plexiforme externa del BOP. Mientras que, en el caso del BOA, la inervación más densa se encuentra en la capa plexiforme interna, seguida de la capa mitral, la capa granular y la capa plexiforme externa, teniendo como elemento neural común a la célula granular (McLean y cols., 1989).

Cabe mencionar que, debido a la inervación del locus coeruleus sobre el BO, éste núcleo también tiene un papel importante en el reconocimiento olfatorio durante la cópula. En la hembra de ratón, se ha reportado un incremento de noradrenalina, la cual reduce la transmisión inhibitoria de GABA de las neuronas granulares a las neuronas mitrales, esto induce una memoria olfativa ante las feromonas presentes durante la cópula. De esta manera, la hembra puede reconocer a su pareja sexual, y sí es expuesta a las feromonas de otro macho, hasta tres días después de copular, se produce un bloqueo de la preñez conocido como efecto Bruce (Bruce, 1959). Otros núcleos noradrenérgicos, A1 y A2, procesan la información ascendente de la

estimulación vaginocervical que la hembra recibe durante la cópula. Específicamente, dicha estimulación vaginocervical es detectada por neuronas sensoriales viscerales de la vagina y el cérvix, incluyendo los nervios pélvico e hipogástrico. Sin embargo, el nervio pélvico es esencial para comunicar la información sensorial al sistema nervioso central para la inducción de la preñez o la pseudopreñez. Posteriormente, las aferentes del nervio pélvico entran a nivel lumbo-sacro (L6-S1) de la médula espinal a la lámina I y II del asta dorsal. Después, la información vaginocervical asciende por los tractos espinales para activar diversos núcleos del tallo cerebral, entre ellos los grupos celulares noradrenérgicos A1 y A2, principalmente, aunque no se descarta al locus coeruleus. A su vez, estas neuronas mandan sus proyecciones principales a través del haz noradrenérgico ventral (VNAB, por sus siglas en inglés) al cerebro anterior, incluyendo al VMH y a la MePD. Estas últimas estructuras son las encargadas de inducir los cambios necesarios para el mantenimiento de la preñez o la pseudopreñez en la rata hembra (Northrop y cols., 2010), los cuales cabe resaltar surgen preferencialmente cuando la hembra regula la cópula. Por lo que, se puede sugerir que las fibras centrífugas provenientes de los mencionados núcleos noradrenérgicos o fibras centrífugas del hipotálamo y la amígdala pueden estar involucradas en la potenciación de la neurogénesis bulbar promovida por la cópula regulada repetida. Sin embargo, como ya se ha mencionado, debe existir una sinergia entre la activación sensorial (fibras centrípetas) y la activación central (fibras centrífugas) durante la cópula, de tal manera que se induzca un incremento en la supervivencia de las neuronas nuevas.

Por otro lado, hay que considerar que en el proceso neurogénico están involucrados varios factores, como hormonas, neurotransmisores, neuromoduladores y factores de crecimiento (Hagg, 2005). Por ejemplo, se ha reportado la expresión del receptor a péptidos opioides en las regiones neurogénicas y en las células progenitoras, lo cual sugiere que los opioides tienen un papel funcional en la regulación de la neurogénesis (Persson y cols., 2003; Tong y cols., 2000). En relación a esto, se ha descrito que la cópula regulada por la hembra aumenta la actividad del sistema de opioides en diferentes estructuras cerebrales que se correlaciona con un estado afectivo positivo (García-Horsman y cols., 2008). Es por esto, que proponemos que los opioides liberados durante la cópula regulada pueden afectar la actividad de los nichos

neurogénicos, y por lo tanto, tener un efecto sobre la proliferación y/o la sobrevivencia de las neuronas nuevas.

Con respecto a la regulación hormonal, ya hemos mencionado los efectos proliferativos que pueden tener el estradiol (Smith y cols., 2001; Tanapat y cols., 1999) y la progesterona (Liu y cols., 2009; Zhang y cols., 2010) sobre los nichos neurogénicos. Sin embargo, si consideramos que los tres grupos de hembras ovariectomizadas y suplementadas, dentro de un mismo esquema de dosis y tiempo, con E2 y P4 (control, CR 1h-4 y CNR 1h-4) muestran niveles plasmáticos hormonales similares seis horas después de la última administración de P4 y 54 horas después de la de E2. Nuestros resultados no pueden correlacionarse con los niveles circulantes de éstas hormonas, ya que existe una clara diferencia significativa entre la cantidad de células y neuronas nuevas en el grupo CR 1h-4 con respecto a los otros dos grupos.

4.2 CONCLUSIONES

La repetición de la estimulación sexual regulada por la rata hembra tiene un efecto potenciador sobre el número de neuronas nuevas presentes en la capa granular del bulbo olfatorio principal y la capa celular interna del bulbo olfatorio accesorio. No encontramos cambios en la proporción de neuronas nuevas con respecto al número de células ir-BrdU en los grupos de cópula regulada. Estos resultados indican que la cantidad y calidad de la cópula regulada induce cambios, fisiológicos, plásticos y conductuales (estado afectivo positivo) que son fundamentales para la reproducción. En este estudio, tampoco encontramos diferencias en los niveles plasmáticos de estradiol y progesterona entre las hembras control y las que copularon repetidamente, por lo que no hay una relación directa entre los niveles circulantes de estas hormonas con una mayor cantidad de neuronas nuevas en el bulbo olfatorio de las hembras que repiten la cópula regulada.

Es posible que algunas de las estructuras corticales involucradas en la expresión de la conducta sexual, las cuales son estimuladas de manera diferencial durante la cópula regulada, estén promoviendo la sobrevivencia de las nuevas neuronas a través de fibras centrífugas que fortalezcan la estimulación sensorial olfativa que la hembra recibe cuando se encuentra en contacto con el macho.

Estudios posteriores deberán explorar la posible participación de factores de crecimiento, neuromoduladores y otras hormonas como reguladores de la neurogénesis inducida por la estimulación sexual regulada.

REFERENCIAS

- Agmo A y Berenfeld R. 1990. Reinforcing properties of ejaculation in the male rat: role of opioids and dopamine. *Behav Neurosci.* 104, 177-182.
- Agmo A y Gómez M. 1993. Sexual reinforcement is blocked by infusion of naloxone into the medial preoptic area. *Behav Neurosci.* 107, 812-8.
- Allen E. 1916. Studies on cell division in the albino rat (*Mus norvegicus*, var. *alba*). II. Experiments on technique, with description of a method for demonstrating the cytological details of dividing cells in brain and testis. *Anat Rec.* 10, 565-589.
- Allen WM. 1931. Cyclic alternations of the endometrium of the rat during the normal cycle, pseudopregnancy and pregnancy. *Anat. Rec.* 48,65.
- Alvarez-Buylla A y García- Verdugo JM. 2002. Neurogenesis in Adult Subventricular Zone. *J Neurosci.* 22, 629- 634.
- Alvarez-Buylla A y Lois C. 1995. Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrates. *Stem cells.* 13, 263–272.
- Arias- Carrión O, Olivares- Bañuelos T y Drucker- Colín R. 2007. Neurogénesis en el cerebro adulto. *Rev Neurol.* 44, 541- 550.
- Arzate DM, Portillo W, Rodríguez C, Corona C y Paredes RG. 2011. Extended paced mating tests induces conditioned place preference without affecting sexual arousal. *Horm Behav.* 59, 674-680.
- Ball, J. 1937. A test for measuring sexual excitability in the female rat. *Comp. Psychol. Monographs.* 14,1-37.
- Batterton MN, Robarts D, Woodley SK y Baum MJ. 2006. Comparison of odor and mating-induced glomerular activation in the main olfactory bulb of estrous female ferrets. *Neurosci Lett.* 400, 224-229.
- Bédard A y Parent A. 2004. Evidence of newly generated neurons in the human olfactory bulb. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 151, 159- 168.
- Blanchart A, De Carlos JA y López-Mascaraque L. 2006. Time frame of mitral cell development in the mice olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 496, 529-543.

- Blaustein JD y Mani SK. 2007. Feminine sexual behavior from neuroendocrine and molecular neurobiological perspectives. En A. Lajtha y J.D. Blaustein (Eds.) Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology. (pp. 95-150), Springer.
- Brännvall K, Bogdanovic N, Korhonen L y Lindholm D. 2005. 19-nortestosterone influences neural stem cell proliferation and neurogenesis in the rat brain. *Eur J Neurosci.* 21, 871-878.
- Broadwell RD y Jacobowitz DM. 1976. Olfactory relationships of the telencephalon and diencephalon in the rabbit. III. The ipsilateral centrifugal fibers to the olfactory bulbar and retrobulbar formations. *J Comp Neurol.* 170, 321-345.
- Bruce HM. 1959. An exteroceptive block of pregnancy in the mouse. *Nature.* 184, 105.
- Brummelte S y Galea LA. 2010. Chronic high corticosterone reduces neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rats. *Neuroscience.* 168, 680–690.
- Buck L y Axel R. 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell.* 65, 175–187.
- Cameron HA y McKay RD. 1999. Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat Neurosci.* 2, 894-897.
- Coopersmith C, Candurra C y Erskine MS. 1996. Effects of paced mating and intromissive stimulation on feminine sexual behavior and estrus termination in the cycling rat. *J Comp Psychol.* 110, 176-186
- Corona R, Larriva-Sahd y Paredes RG. 2011. Paced-mating increases the number of adult new born cells in the internal cellular (granular) layer of the accessory olfactory bulb. *Plos One.* 6, e19380.
- de Olmos J, Hardy H y Heimer L. 1978. The afferent connections of the main and accessory olfactory bulb formations in the rat: an experimental HRP-study. *J Comp Neurol.* 181, 213-244.
- Dulac C y Wagner S. 2006. Genetic analysis of brain circuits underlying pheromone signaling. *Annu Rev Genet.* 40, 449- 467.

- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk- Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson D.A. y Gage FH. 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.* 4, 1313- 7.
- Erskine MS. 1989. Solicitation behavior in the estrous female rat: A review. *Horm Behav.* 23, 473-502.
- Erskine MS y Baum MJ. 1982. Effects of paced coital stimulation on termination of estrus and brain indoleamine levels in female rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 17, 857- 61.
- Erskine MS y Kornberg E. 1992. Acute luteinizing hormone and prolactin responses to paced mating stimulation in the estrous female rat. *J Neuroendocrinol.* 4, 173-179.
- Erskine MS, Kornberg E y Cherry JA. 1989. Paced copulation in rats: effects of intromission frequency and duration on luteal activation and estrus length. *Physiol Behav.* 45, 33-9.
- García-Horsman SP, Agmo A, Paredes RG. 2008. Infusions of naloxone into the medial preoptic area, ventromedial nucleus of the hypothalamus, and amygdala block conditioned place preference induced by paced mating behavior. *Horm Behav.* 54, 709- 716.
- González-Pérez O y Alvarez-Buylla. 2011. Oligodendrogenesis in the subventricular zone and the role of epidermal growth factor. *Brain Res Rev.* 67, 147-156.
- Guerra-Araiza C, Villamar-Cruz O, Gonzalez-Arenas A, Chavira R y Camacho-Arroyo I. 2003. Changes in progesterone receptor isoforms content in the rat brain during the oestrous cycle and after oestradiol and progesterone treatments, *J. Neuroendocrinol.* 15,984–990.
- Hagg T. 2005. Molecular regulation of adult CNS neurogenesis: an integrated view. *Trends Neurosci.* 28, 589-95.
- Hagihara K, Hirata S, Osada T, Hirai M y Kato J.1992. Distribution of cells containing progesterone receptor mRNA in the female rat di- and telencephalon: an in situ hybridization study. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 14,239–249.

- Hahn CG, Han LY, Rawson NE, Mirza N, Borgmann-Winter K, Lenox RH y Arnold SE. 2005. In vivo and in vitro neurogenesis in human olfactory epithelium. *J Comp Neurol.* 483, 154-163.
- Hardy DF y DeBold JF. 1972. Effects of coital stimulation upon behavior of the female rat. *J Comp Physiol Psychol.* 78, 400-408.
- Isgor C y Watson SJ. 2005. Estrogen receptor alpha and beta mRNA expressions by proliferating and differentiating cells in the adult rat dentate gyrus and subventricular zone. *Neuroscience.* 134, 847-856.
- Karishma KK y Herbert J. 2002. Dehydroepiandrosterone (DHEA) stimulates neurogenesis in the hippocampus of the rat, promotes survival of newly formed neurons and prevents corticosterone-induced suppression. *Eur J Neurosci.* 16, 445-453.
- Keller M, Douhard Q, Baum MJ y Bakker J. 2006a. Destruction of the main olfactory epithelium reduces female sexual behavior and olfactory investigation in female mice. *Chem Senses.* 31, 315-23.
- Keller M, Douhard Q, Baum MJ y Bakker J. 2006b. Sexual experience does not compensate for the disruptive effects of zinc sulfate-lesioning of the main olfactory epithelium on sexual behavior in male mice. *Chem Senses.* 31, 753-762.
- Kelsch W, Lin CW y Lois C. 2008. Sequential development of synapses in dendritic domains during adult neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci.* 105, 16803-8.
- Kempermann G. 2006. *Adult Neurogenesis. Stem Cells and Neuronal Development in the Adult Brain.* New York: Oxford University Press.
- Kermen F, Sultan S, Sacquet J, Mandarion N y Didier A. 2010. Consolidation of an olfactory memory trace in the olfactory bulb is required for learning- induced survival of adult- born neurons and long- term memory. *PLoS One.* 5, e12118.
- Kornberg E y Erskine MS. 1994. Effects of differential mating stimulation on the onset of prolactin surges in pseudopregnant rats. *Psychoneuroendocrinology.* 19, 357- 71.

- Krieger MS, Orr D y Perper T. 1976. Temporal patterning of sexual behavior in the female rat. *Behav Biol.* 18, 379-386.
- Larriva-Sahd. 2008. The accessory olfactory bulb in the adult rat: a cytological study of its cell types, neuropil, neuronal modules, and interactions with the main olfactory system. *J Comp Neurol.* 510, 309-350.
- Lazarini F y Lledo PM. 2011. Is adult neurogenesis essential for olfaction? *Trends Neurosci.* 34, 20-30.
- LeFevre J y McClintock MK. 1988. Reproductive senescence in female rats: a longitudinal study of individual differences in estrous cycles and behavior. *Biol Reprod.* 38, 780-789.
- Lehmann ML, McKellar H y Erskine MS. 2005. Coding for the initiation of pseudopregnancy by temporally patterned activation of amygdalar NMDA receptors. *J Neurosci.* 25, 8696-8703.
- Leuner B, Glasper ER y Gould E. 2010. Sexual experience promotes adult neurogenesis in the hippocampus despite an initial elevation in stress hormones. *Plos One.* 5, e11597.
- Liu L, Wang J, Zhao L, Nilsen J, McClure K, Wong K y Brinton RD. 2009. Progesterone increases rat neural progenitor cell cycle gene expression and proliferation via extracellularly regulated kinase and progesterone receptor membrane components 1 and 2. *Endocrinology.* 150, 3186-3196.
- Mackay- Sim A y Rose JD. 1986. Removal of the vomeronasal organ impairs lordosis in female hamsters: effect is reversed by luteinising hormone- releasing hormone. *Neuroendocrinology.* 42, 489- 93.
- Mak G, Enwere EK, Gregg C, Pakarainen T, Poutanen M, Huhtaniemi I y Weiss S. 2007. Male pheromone- stimulated neurogenesis in the adult female brain: possible role in mating behaviour. *Nat Neurosci.* 10, 1003-1011.
- Mani SK, Mermelstein PG, Tetel MJ y Anesetti G. 2012. Convergence of multiple mechanisms of steroid hormone action. *Horm Metab Res. EJournal.*

- Mani SK, Portillo W y Reyna A. 2009. Steroid hormone action in the brain: cross-talk between signalling pathways. *J Neuroendocrinol.* 21, 243-247.
- Martel KL y Baum MJ. 2007. Sexually dimorphic activation of the accessory, but not the main, olfactory bulb in mice by urinary volatiles. *Eur J Neurosci.* 26, 463-475.
- Martel KL y Baum MJ. 2009. A centrifugal pathway to the mouse accessory olfactory bulb from the medial amigdala conveys gender-specific volatile pheromonal signals. *Eur J Neurosci.* 29, 368-76.
- Martínez I, Paredes RG. 2001. Only self-paced mating is rewarding in rats of both sexes. *Horm Behav.* 40, 510- 517.
- Martínez-Marcos A. 2009. On the organization of olfactory and vomeronasal cortices. *Prog Neurobiol.* 87, 21-30.
- Martínez-Marcos A y Halpern M. 1999. Differential centrifugal afferents to the anterior and posterior accessory olfactory bulb. *Neuroreport.* 10, 2011-2015.
- Martínez-Ricós J, Agustín-Pavón C, Lanuza E y Martínez-García F. 2008. Role of the vomeronasal system in intersexual attraction in female mice. *Neuroscience.* 153, 383-395.
- Masini CV, Garcia RJ, Sasse SK, Nyhuis TJ, Day HE y Campeau S. 2009. Accessory and main olfactory systems influences on predator odor-induced behavioral and endocrine stress response in rats. *Behav Brain Res.* 207, 70-7.
- McClintock MK y Anisko JJ. 1982. Group mating among Norway rats. I. Sex differences in the pattern and neuroendocrine consequences of copulation. *Anim. Behav.* 30, 398-409.
- McLean JH, Shipley MT, Nickell WT, Aston-Jones G y Reyher CK. 1989. Chemoanatomical organization of the noradrenergic input from locus coeruleus to the olfactory bulb of the adult rat. *J Comp Neurol.* 285, 339-349.
- Moulton DG. 1975. Cell renewal in the olfactory epithelium of the mouse. En Denton DA y Coghlan JP (Eds.), *Olfaction and taste.* (pp.111-114), New York: Academic.

- Mouret A, Murray K y Lledo PM. 2009. Centrifugal drive onto local inhibitory interneurons of the olfactory bulb. *Ann N Y Acad Sci.* 1170, 239-254.
- Mullen RJ, Buck CR y Smith AM. 1992. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development.* 116, 201-11.
- Nissant A y Pallotto M. 2011. Integration and maturation of newborn neurons in the adult olfactory bulb-from synapses to function. *Eur J Neurosci.* 33, 1069-77.
- Northrop LE, Polston EK y Erskine MS. 2010. Noradrenergic nuclei that receive sensory input during mating and project to the ventromedial hypothalamus play a role in mating-induced pseudopregnancy in the female rat. *J Neuroendocrinol.* 22, 1061-1071.
- Oboti L, Schellino R, Giachino C, Chamero P, Pyrski M, Leinders-Zufall T, Zufall F, Fasolo A y Peretto P. 2011. Newborn interneurons in the accessory olfactory bulb promote mate recognition in female mice. *Front Neurosci.* 5,113.
- Paredes RG. 2009. Evaluating the neurobiology of sexual reward. *Ilar J.* 50:15-27.
- Paredes RG y Fernández- Guasti A. 2008. Rewarding properties of mating. En M. Méndez y R. Mondragón- Ceballos (Eds.) *Neural mechanisms of drugs of abuse and natural reinforcers.* (pp. 159-170), Kerala: Research Signpost.
- Paredes RG y Vázquez B. 1999. What do female rats like about sex? Paced mating. *Behav Brain Res.* 105, 117- 27.
- Peirce JT y Nuttall RL. 1961. Self-paced sexual behavior in the female rat. *J Comp Physiol Psychol.* 54, 310-313.
- Persson AI, Thorlin T, Bull C, Zarnegar P, Ekman R, Terenius L y Eriksson PS. 2003. Mu- and delta- opioid receptor antagonists decrease proliferation and increase neurogenesis in cultures of rat adult hippocampal progenitors. *Eur J Neurosci.* 17, 1159- 1172
- Peteanu L y Alvarez-Buylla A. 2002. Maturation and Death of Adult- Born Olfactory Bulb Granule Neurons: Role of Olfaction. *J Neurosci.* 22, 6106- 6113.

- Ramirez-Rodriguez G, Ortíz-López L, Domínguez-Alonso A, Benítez-King GA, Kempermann G. 2011. Chronic treatment with melatonin stimulates dendrite maturation and complexity in adult hippocampal neurogenesis of mice. *J Pineal Res.* 50, 29-37.
- Ramón y Cajal S. 1913. Estudios sobre la degeneración y la regeneración del sistema nervioso. Madrid. Imprenta de Hijos de Nicolás Moya.
- Reiter RJ. 1991. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev.* 12, 151–180.
- Rowe DW y Erskine MS. 1993. c-Fos proto-oncogene activity induced by mating in the preoptic area, hypothalamus and amygdala in the female rat: role of afferent input via the pelvi nerve. *Brain Res.* 621, 25-34.
- Saito TR y Moltz H. 1986. Sexual behavior in the female rat following removal of the vomeronasal organ. *Physiol Behav.* 38, 81-7.
- Sanai N, Nguyen T, Ihrie RA, Mirzadeh Z, Tsai HH, Wong M, Gupta N, Berger MS, Huang E, García-Verdugo JM, Rowitch DH y Alvarez-Buylla A. 2011. *Nature.* 478, 382-386.
- Schoenfeld TJ y Gould E. 2012. Stress, stress hormones, and adult neurogenesis. *Exp Neurol.* 233, 12-21
- Shepherd GM. 1994. Discrimination of molecular signals by the olfactory receptor neuron. *Neuron.* 13, 771- 90.
- Shingo T, Gregg C, Enwere E, Fujikawa H, Hassam R, Geary C, Cross JC y Weiss S. 2003. Pregnancy- stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science.* 299, 117- 20.
- Shibley MT, Halloran FJ y de la Torre J. 1985. Surprisingly rich projection from locus coeruleus to the olfactory bulb in the rat. *Brain Res.* 329, 294-299.
- Shughrue PJ, Lane MV y Merchenthaler I. 1997. Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol.* 388, 507-525.

- Slotnick B, Restrepo D, Schellinck H, Archbold G, Price S y Lin W. 2010. Accessory olfactory bulb function is modulated by input from the main olfactory epithelium. *Eur J Neurosci.* 3, 1108-1116.
- Smith MT, Pencea V, Wang Z, Luskin MB y Insel TR. 2001. Increased number of BrdU-labeled neurons in the rostral migratory stream of the estrous prairie vole. *Horm Behav.* 39, 11-21.
- Spanswick SC, Lehmann H, Sutherland RJ. 2011. A novel animal model of hippocampal cognitive deficits, slow neurodegeneration, and neuroregeneration. *J Biomed Biotechnol.* 2011: 527201.
- Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ y Gould E. 1999. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci.* 19, 5792-801.
- Tong Y, Chabot JG, Shen SH, O'Dowd BF, George SR y Quirion R. 2000. Ontogenic profile of the expression of the mu opioid receptor gene in the rat telencephalon and diencephalon: an in situ hybridization study. *J Chem Neuroanat.* 18, 209-22.
- Valverde F. 2003. El bulbo olfativo: un modelo para estudios experimentales. *Neurología.* 18, 177-186.
- Whalen RE. 1974. Estrogen-progesterone induction of mating in female rats. *Horm and Behav.* 5, 157-162.
- Whitman MC y Greer CA. 2007. Synaptic integration of adult-generated olfactory bulb granule cells: basal axodendritic centrifugal input precedes apical dendrodendritic local circuits. *J Neurosci.* 27, 9951-9961.
- Whitman MC y Greer CA. 2009. Adult neurogenesis and the olfactory system. *Prog Neurobiol.* 89, 162- 75.
- Xia J, Sellers LA, Oxley D, Smith T, Emson P y Keverne EB. 2006. Urinary pheromones promote ERK/Akt phosphorylation, regeneration and survival of vomeronasal (V2R) neurons. *Eur J Neurosci.* 24, 3333-42.

- Yamaguchi M y Mori K. 2005. Critical period for sensory experience-dependent survival of newly-generated granule cells in the adult mouse olfactory bulb. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 9697-9702.
- Yassa MA, Mattfeld AT, Stark SM y Stark CE. 2011. Age- related memory deficits linked to circuit- specific disruptions in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108, 8873-8.
- Ydstebø R y Södersten P. 1977. Induction of sexual receptivity in ovariectomized female rats by subcutaneous implants of estradiol-17 β . *Horm and Behav.* 9, 130-140.
- Yen SSC, Jaffe RB y Barbieri RL. 2001. Prolactina en la Reproducción Humana. En: *Endocrinología de la Reproducción.* Medica Panamericana. Pp. 912.
- Zhang Z, Yang R, Zhou R, Li L, Sokabe M y ChenL. 2010. Progesterone promotes the survival of newborn neurons in the dentate gyrus of adult male mice. *Hippocampus.* 20, 402-12.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sistemas olfatorios de la rata. El sistema vomeronasal (izquierda) incluye al BOA que recibe aferencias sensoriales del órgano vomeronasal (OVN) y proyecta a la amígdala medial (MeA/MeP) y al núcleo cortical amigdaloides posteromedial (PMCN) con conexiones adicionales al núcleo lecho de la estría terminal posterior (BNSTp). El sistema olfatorio principal (derecha) incluye al BOP que recibe aferencias sensoriales del epitelio olfatorio principal (MOE) y proyecta al núcleo cortical anterior (AON), al tubérculo olfatorio (OT), a la tenia tecta (TT), a la corteza piriforme (Pir) y a la corteza entorrinal (EC). Ambos sistemas tienen conexiones con el hipotálamo. Modificado de Dulac y Wagner, 2006.

Figura 2. Representación de la relación entre el estradiol y la progesterona durante el ciclo estral de la rata hembra. Modificado de Blaustein y Mani, 2007.

Figura 3. Representación del mecanismo de acción de los receptores a hormonas esteroideas. En la vía clásica de activación de los receptores a hormonas esteroideas la unión de la hormona al receptor conlleva un cambio conformacional, la disociación de las proteínas de choque térmico, la dimerización del receptor y la unión del complejo a las secuencias de ADN blanco (elementos de respuesta a la hormona). Algunos neurotransmisores y factores de crecimiento pueden activar segundos mensajeros y vías de proteínas cinasas por una vía rápida (independiente de ligando) para activar receptores y/o coactivadores. Adaptado de Blaustein y Mani, 2007. CBP (proteína de unión a CREB); SRC (coactivador del receptor a esteroideas); TF (factor de transcripción).

Figura 4. Diagrama de las posibles aferencias sensoriales centrípetas y aferencias centrífugas de estructuras centrales que pueden regular la neurogénesis promovida por la cópula regulada repetida en la rata hembra adulta. Amígdala medial posterodorsal (MePD), hipotálamo ventromedial (VMH), área preóptica medial (MPOA), locus coeruleus (A6) y bulbo olfatorio (BO).

Figura 4. Diseño experimental que muestra la manipulación de los grupos control, cópula regulada durante una sesión (CR 1h-1), cópula regulada durante cuatro sesiones (CR 1h-4) y cópula no regulada durante cuatro sesiones (CNR 1h-4). El grupo

intacto fue administrado con BrdU durante la fase de proestro tardío del ciclo estral de las hembras.

Figura 6. Micrografías de frotis vaginales de ratas hembra del grupo intacto tomados en las diferentes etapas del ciclo estral. a) Diestro, b) Proestro, c) Estro y d) Metaestro. Objetivo 20x y barra de calibración de 50 μ m.

Figura 7. Fotografías de los aparatos de cópula a) Condición de cópula regulada (nótese la barrera de acrílico en el centro de la caja). La hembra pasa libremente de un compartimento a otro, y por tanto ella regula la cópula. b) Condición de cópula no regulada, en la cual el macho regula la interacción sexual.

Figura 8. Esquema de los grados de lordosis en la hembra ante la monta del macho. Nótese la dorsiflexión del dorso de la hembra. a) Lordosis cero, b) lordosis uno y c) lordosis dos (adaptada de Hardy y DeBold, 1972).

Figura 9. Corte sagital de bulbo olfatorio de rata hembra con tinción de Nissl. En la micrografía (4x) se muestran las áreas en las que se cuantificaron células ir- BrdU en cada una de las capas glomerular (Glo), mitral (Mi) y granular (Gra) del BOP y glomerular (Glo), celular externa (CCE) y celular interna (CCI) del BOA. Barra de calibración de 500 μ m.

Figura 10. Corte sagital de bulbo olfatorio de rata hembra con tinción de Nissl. En la micrografía (4x) se muestran las áreas en las que se cuantificaron células ir- BrdU/NeuN en la capa granular del BOP y celular interna del BOA.

Figura 11. Número de células BrdU inmunorreactivas por grupo (n=7) en la capa glomerular (a), capa celular externa (b) y capa celular interna (c) del BOA.

Figura 12. Número de células BrdU inmunorreactivas por grupo (n=7) en la capa glomerular (a), capa mitral (b) y capa granular (c) del BOP.

Figura 13. Número de células doblemente marcadas con BrdU/NeuN en la capa celular interna del BOA. Los números dentro de las columnas representan el porcentaje de células doblemente marcadas con BrdU/NeuN con respecto a las inmunorreactivas sólo para BrdU. n=4.

Figura 14. Número de células doblemente marcadas con BrdU/NeuN en la capa granular del BOP. Los números dentro de las columnas representan el porcentaje de células doblemente marcadas con BrdU/NeuN con respecto a las inmunorreactivas sólo para BrdU. n= 3

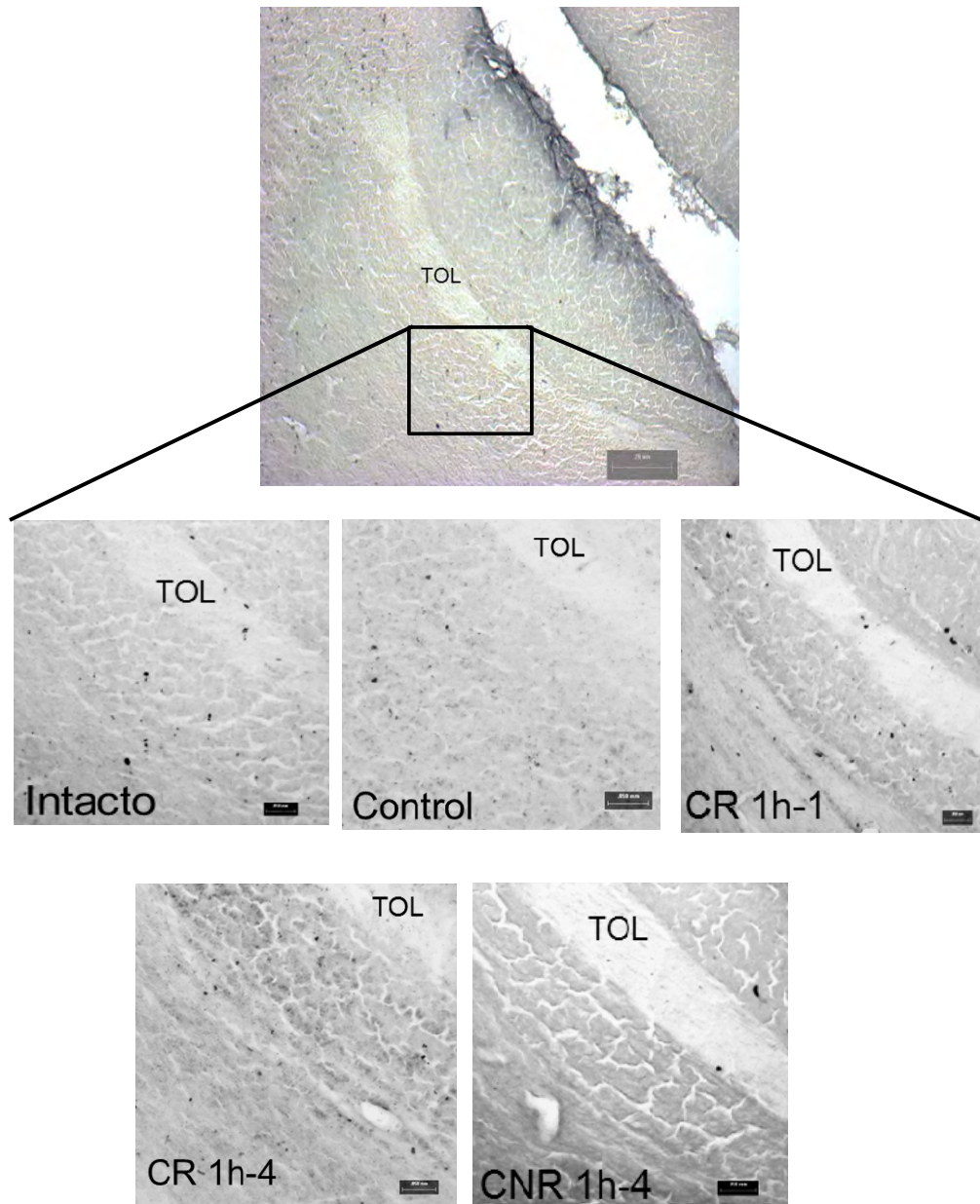
Figura 15. a) Concentración plasmática de estradiol en pg/ml; b) Concentración plasmática de progesterona en ng/ml. n= 5.

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Parámetros de conducta sexual registrados durante la única sesión o las cuatro sesiones de cópula según corresponda. Los datos se expresan como el promedio \pm el error estándar (e.e)

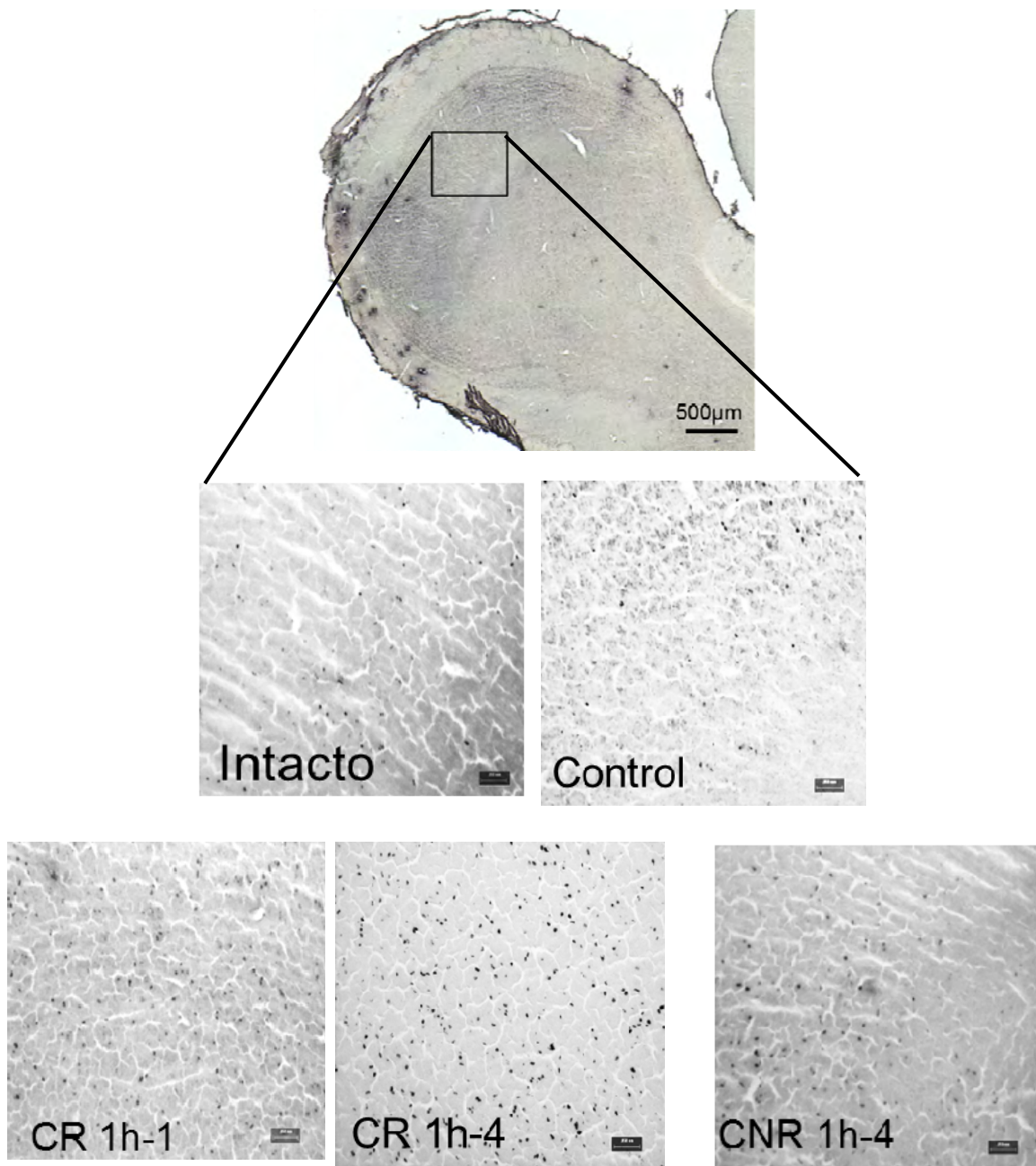
Tabla II. Porcentaje de células doblemente marcadas BrdU/NeuN (neuronas nuevas) con respecto al número de células marcadas con BrdU (células nuevas) en la CCI del BOA y la capa granular del BOP.

APÉNDICE A. NÚMERO DE CÉLULAS IR-BRDU EN LA CCI DEL BOA



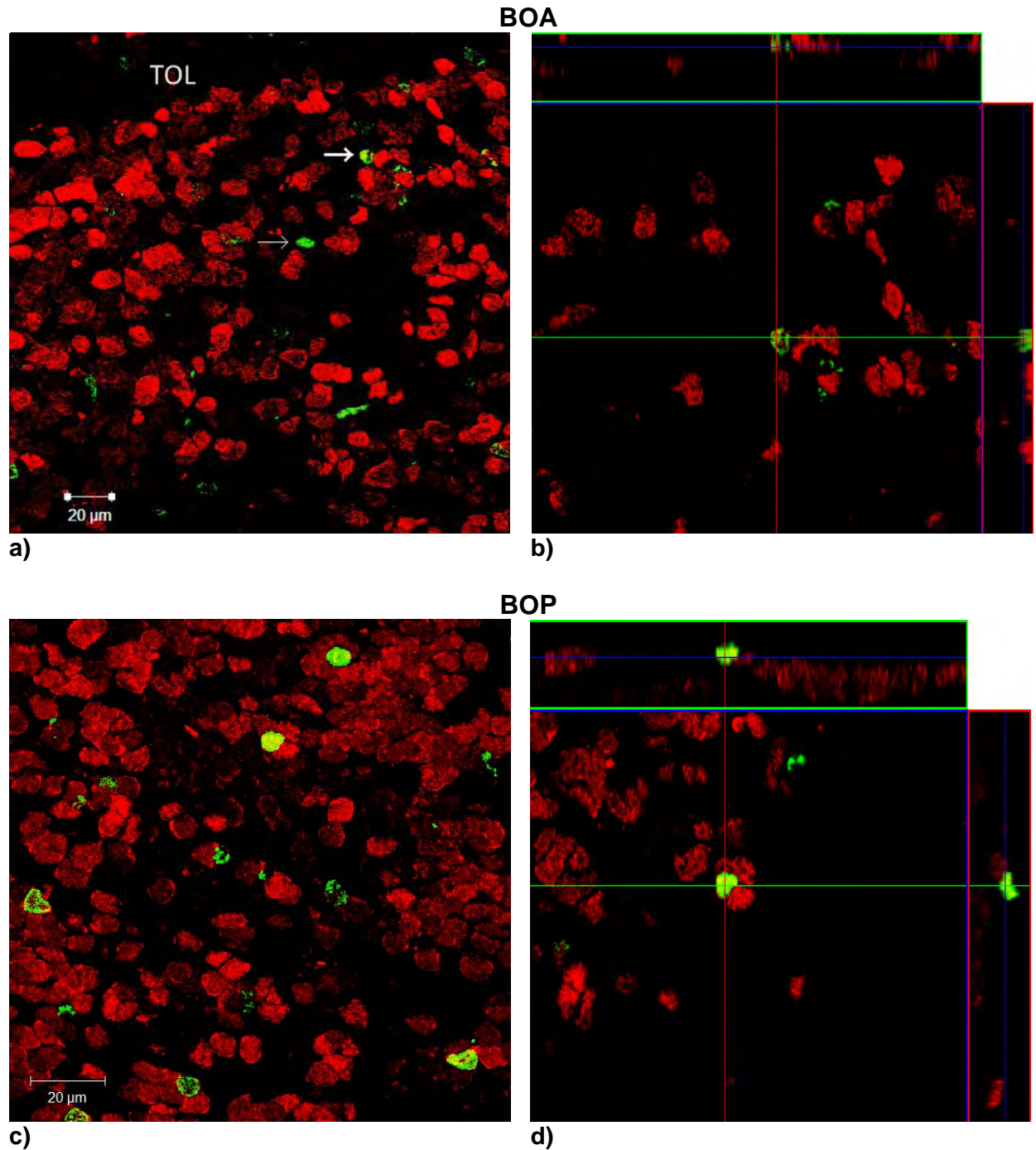
Micrografía tomada con objetivo 4x de un corte sagital del bulbo olfatorio accesorio con marcaje para células ir- BrdU (barra de calibración de 200µm). Para representar a los cinco grupos experimentales se incluyeron micrografías capturadas con el objetivo 10x tomadas en la misma región de la capa celular interna (barra de calibración de 50µm). Nótese la mayor cantidad de células ir- BrdU en el grupo de cópula regulada repetida (CR1h-4). TOL (tracto olfatorio lateral).

APÉNDICE B. NÚMERO DE CÉLULAS IR-BRDU EN LA CAPA GRANULAR DEL BOP



Reconstrucción micrográfica tomadas con objetivo 4x de un corte sagital del bulbo olfatorio principal con marcaje para células ir- BrdU (barra de calibración de 500µm). Para representar a los cinco grupos experimentales se incluyeron micrografías capturadas con el objetivo 10x tomadas en la misma región de la capa granular (barra de calibración de 50µm). Nótese la mayor cantidad de células ir- BrdU en el grupo de cópula regulada repetida (CR1h-4).

APÉNDICE C. CÉLULAS IR-BRDU/NEUN EN LA CCI DEL BOA Y EN LA CAPA GRANULAR DEL BOP



Micrografías tomadas con un microscopio confocal Zeiss LSM 510. Se pueden observar varias células doblemente marcadas (amarillo) con BrdU (verde) y NeuN (rojo) en la capa celular interna (CCI) BOA (a) y en la capa granular del BOP (c) de una rata hembra del grupo de CR1h-4. En b) y d) se observa el corte ortogonal para comprobar el doble marcaje con BrdU y NeuN de una célula, es decir, una neurona nueva. TOL (tracto olfatorio lateral).