



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

EFFECTO DE LA CONDUCTA SEXUAL/FORMACIÓN DE VÍNCULO DE PAREJA SOBRE EL ESTABLECIMIENTO DE NEURONAS NUEVAS EN *MICROTUS OCHROGASTER*

TESIS:

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

LIC. EN QFB TANIA ELIRE AGUILAR GARCÍA

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. WENDY PORTILLO MARTÍNEZ

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. MARÍA TERESA MORALES GUZMÁN

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

DR. SARAEL ALCAUTER SOLORZANO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

El vínculo de pareja es un rasgo característico de un sistema social y de apareamiento monógamo. Esta conducta es desplegada por los topillos de la pradera (*Microtus ochrogaster*) después de seis horas de cohabitación y al menos dos series copulatorias. El presente estudio pretende determinar si la cohabitación con cópula por un período de seis horas incrementa la neurogénesis en los topillos de la pradera. Cuarenta y ocho topillos (24 hembras y 24 machos) sin experiencia sexual fueron asignados al azar en tres grupos: controles, exposición social y cohabitación social con cópula. Para identificar a las células nuevas en el bulbo olfatorio accesorio (BOA) y principal (BOP), la amígdala (AMG), el área preóptica medial (APM) y el hipotálamo ventromedial (HVM), se utilizó la 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU), la cual fue administrada a los topillos tres veces el día de la prueba conductual. Quince días después todos los animales recibieron eutanasia con una sobre dosis de anestesia, fueron perfundidos con solución buffer de fosfatos (PBS) y se recolectó el tejido cerebral. Las secciones cerebrales fueron procesadas por la técnica de inmunohistoquímica revelada con diaminobencidina (DAB) y fluorescencia para la detección de BrdU y NeuN. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de células (BrdU+) y neuronas nuevas (BrdU+/NeuN+) en BOA, el BOP, la AMG, el HVM y el APM entre la condición de vínculo en hembras y machos respecto a los otros grupos. Los resultados obtenidos muestran que el proceso de neurogénesis no interviene en la formación del vínculo de pareja en el topillo, en contraste con el papel que juega en la discriminación de olores.

ABSTRACT

Pair bonding is a hallmark of social monogamy that is displayed by prairie voles (*Microtus ochrogaster*) after 6 hrs. of cohabitation with mating. The current study further explores whether cohabitation with mating for 6 hrs. increases neurogenesis. Forty-eight voles (24 males and 24 females) were randomly assigned into three groups: controls, social exposure and social cohabitation with mating. In this paradigm, to identify new cells in main olfactory bulb(MOB), accessory olfactory bulb (AOB), the amygdala (AMG), the medial preoptic area (MPOA) and the ventromedial hypothalamus (VMH); 5-bromo-2- deoxyuridine (BrdU) was administrated 3 times to each group. Fifteen days later voles were perfused with PBS and brain tissue was collected. Brain sections were processed for immunostaining detected with DAB and fluorescent dyes to identify BrdU and NeuN. No differences in the number of new cells (BrdU+) and new neurons (BrdU+/NeuN+) were found in the MOB, the BOA, the AMG, the VMH and the medial preoptic area (MPOA) between the condition of pair bonding in males and females respect the other conditions. These results do not support a role for neurogenesis in pair bonding formation in voles but it does in the odor discrimination.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por brindarme la oportunidad de cursar mis estudios de posgrado en instalaciones de calidad y docentes bien calificados.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme el apoyo económico para el sustento de mis estudios.

Becario No: 696133

Donativos: CONACYT 252756, 167101,253631; Fronteras 374; UNAM-DGAPA-PAPIIT IN203615, IN210215; Instituto Nacional de Perinatología 212250-3230-21216-05-15.

A Elsa Nydia Hernández Ríos, encargada de la Unidad de Microscopía (confocal) por el uso del equipo para la realización mi proyecto.

Al Dr. Francisco J. Valles Valenzuela, responsable de la Biblioteca por permitirme el uso de material bibliográfico durante mis estudios y a la Lic. Teresa Soledad Medina Malagón.

Al MVZ José Martín García Servín y a Alejandra Castilla León, encargados del Bioterio por el préstamo de animales y asistencia técnica.

A la Unidad de Conducta, por su apoyo técnico a la Dra. Deisy Gasca Martínez.

Al Ing. Ramón Martínez Olvera, al M en C. Alberto Lara Ruvalcaba, al Ing. Omar González Hernández y a la Ing. Sandra Hernández García, responsables de la Unidad de Cómputo, por el apoyo brindado durante mis estudios de posgrado.

A la Lic. María de Lourdes Lara Ayala responsable de la Unidad de Videoconferencia, por su

dedicación y empeño para el correcto funcionamiento de esta unidad.

A los técnicos académicos MVZ Franciso Camacho y Carlos Lozano por su asistencia durante la realización de mis estudios de posgrado.

A mi tutor principal, la Dra. Wendy Portillo Martínez, por el apoyo brindado en la realización de mi trabajo de investigación, asesoría académica y soporte personal durante mis estudios de maestría.

Al Dr. Raúl Gerardo Paredes Guerrero por su asesoría académica durante mi formación profesional.

Al comité tutelar integrado por la Dra. Teresa Morales Guzmán y el Dr. Sarael Alcauter Solorzano por sus aportaciones oportunas y sugerencias objetivas en cada uno de los tutelares presentados y en la revisión del presente trabajo.

A los integrantes del Jurado de Examen; al presidente: Gónzalo Martínez de la Escalera, al secretario: Constantino de Jesús Macías García, a la vocal: Wendy Portillo Martínez y a las suplentes: María Teresa Morales Guzmán y Yazmin Macotela Guzmán; por el tiempo dedicado al presente trabajo.

A la Coordinación de Posgrado, por sus asesoría en los trámites administrativos a Leonor Casanova Rico y Guadalupe Amador Uribe.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A Lidia García por su tiempo, dedicación y amor en cada uno de los momentos de mi vida.

A Jaime Aguilar, por su tiempo, paciencia, cariño y por la ambición y competencia que depositó en mí para lograr mis metas.

A María Luisa Cárdenas y Josefina Márquez por ser los mejores ejemplos a seguir y las abuelas más consentidoras.

A Renata y Gabriela Aguilar, por su incondicional apoyo, compañía y optimismo ante cualquier situación.

A Mafaldo y Dulcecita por depositar su confianza en mí y su amistad, y al resto de mi familia por exigirme día con día y por ser muy importantes para la realización de mis logros.

A mis compañeros de maestría por su motivación y alegría compartida.

A mis compañeros del laboratorio: Lucía Grijalva, Melanie Velazco, Guillermo Valera, Mariana Nuñez y Elisa Ventura por ayudarme a mejorar mi aspecto profesional y académico.

A mis hermanas del alma: Paola Domínguez y Annia Martínez ya mis amigos incondicionales: Gustavo Olvera, Fanny Jaso, Leonardo Fausto, Rebeca Cortés, Pau Marco, Marymar Becerra, Aline Ostos, Marco Zamora, Eduardo Puga y Adán Lara por estar conmigo, por compartir su vida y su tiempo, el cual ha sido excepcional.

A los que dejaron en mí grandes enseñanzas: Yoselin Cortés, Marie Bedos, Francis Manno y Pedro Franco.

A mis nuevas amistades que llegaron con gran entusiasmo y plenitud: Bernadeth Olvera, María José González y Carolina Castañeda.

Y al que me comparte gran avidez, alegría, entusiasmo y amor a mi vida: Oshary Murguía.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ABC	Complejo avidina- biotina
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
AMG	Amígdala
AOI	Área de interés
APM	Área preóptica medial
AVP	Arginina vasopresina
BNST	Núcleo base de la estria terminal
BO	Bulbo olfatorio
BOA	Bulbo olfatorio accesorio
BOP	Bulbo olfatorio principal
BrdU	5'-2'bromo deoxiuridina
CREB	Elemento de unión en respuesta a AMPc
DAB	Diamino bencidina
DCX	Doble cortina
DMSO	Dimetil sulfoxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EOP	Epitelio olfatorio principal
GD	Giro dentado
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
HCl	Ácido clorhídrico
HVc	Hiperestriado ventral
HVM	Hipotálamo ventromedial

III	Intervalo inter-intromisión
IPE	Intervalo post-eyaculatorio
LE	Latencia de eyaculación
LGE	Eminencia gangliogénica lateral
LI	Latencia de intromisión
LM	Latencia de monta
LQ	Coficiente de lordosis
mPN	Núcleo preóptico medial
MAP-2	Proteína asociada a microtúbulos tipo 2
NaCl	Cloruro de sodio
NE	Número de eyaculaciones
NeuN	Proteína nuclear específica neuronal
NI	Número de intromisiones
NM	Número de montas
NSE	Enolasa específica neuronal
NuAc	Núcleo accumbens
OT	Oxitocina
PB	Buffer de fosfatos
PBS	Buffer salino de fosfatos
PCNA	Antígeno de proliferación nuclear celular
PMNv	Núcleos premamilaes nucleares
RNA	Ácido ribonucleico
SNC	Sistema nervioso central
TBS	Buffer salino Tris

TSA	Sistema de amplificación de señal
TuJ1	B tubulina clase III
TX	Tritón X
VMHvl	Porción ventrolateral del hipótalamo ventromedial
VMR	Vía migratoria rostral
VNO	Órgano vomeronasal
VTA	Área tegmental ventral
ZSG	Zona subgranular
ZSV	Zona subventricular

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN.....	1-17
1.1 VÍNCULOS SOCIALES.....	1
1.2 IMPACTO DEL VÍNCULO DE PAREJA EN HUMANOS EN LA SALUD.....	2-4
1.3 MICROTUS OCHROGASTER COMO MODELO ANIMAL PARA EL ESTUDIO DEL VÍNCULO DE PAREJA.....	4-6
1.4 CONDUCTA SEXUAL.....	6-7
1.5 SISTEMA OLFATORIO.....	7-9
1.6 NEUROQUÍMICA DEL VÍNCULO DE PAREJA.....	9-10
1.7 ESTUDIOS DE NEUROGÉNESIS.....	10-12
1.8 NEUROGÉNESIS EN EL BULBO OLFATORIO.....	12-15
1.9 RELACIÓN ENTRE CONDUCTA SEXUAL/FORMACIÓN DE VÍNCULO Y NEUROGÉNESIS.....	15-17
2 ANTECEDENTES.....	17-18
3. JUSTIFICACIÓN.....	18
4. HIPÓTESIS.....	19
5. OBJETIVOS.....	19
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	19
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	19
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	19-27
6.1 SUJETOS DE ESTUDIO.....	19-20
6.2 ESTUDIOS DE NEUROGÉNESIS.....	20
6.3 CONDUCTA SEXUAL Y FORMACIÓN DE VÍNCULO DE PAREJA.....	21
6.4 PERFUSIÓN CEREBRAL/FIJACIÓN.....	21-22
6.5 INMUNOHISTOQUÍMICA DE BRDÜ.....	22
6.6 INMUNOFLUORESCENCIA DE BRDÜ Y NEUN.....	23
6.7 ANÁLISIS MICROSCÓPICO Y CUANTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS MARCADAS CON BRDÜ UTILIZANDO DAB COMO REVELADOR.....	23-26
6.8 ANÁLISIS MICROSCÓPICO Y CUANTIFICACIÓN DE NUEVAS NEURONAS.....	26-27
6.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	27
7. RESULTADOS	
7.1 PARÁMETROS DE LA CONDUCTA SEXUAL.....	28-29

7.2 ESTANDARIZACIÓN INMUNOFLUORESCENCIA BRDU/NEUN.....	29-30
7.3 ESTANDARIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA CON DAB.....	30-31
7.4 CÉLULAS BRDU+ REVELADAS CON DAB.....	32-38
7.5 CÉLULAS BRDU+ REVELADAS CON FLUORESCENCIA.....	38-45
7.6 CÉLULAS BRDU+/NEUN+ REVELADAS CON FLUORESCENCIA Y PORCENTAJE DE DIFERENCIACIÓN NEURONAL.....	45-53
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES.....	53-56
LITERATURA CITADA.....	56-62

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Vínculos sociales

Los vínculos sociales en la especie humana constituyen formas particulares de regulación, a través de las cuales los individuos negocian las normas sociales, ajustándolas a sus intereses y necesidades con el establecimiento de una relación duradera y de tipo emocional con otros individuos a lo largo del tiempo y el espacio (Bowlby, 2007; Salcedo, 2008). En los animales, el proceso de vinculación no es sinónimo de ausencia de separación y ha sido definido como la integración de varias interacciones dependiendo del contexto social; tales como: la relación padre-infante, interacción filial y el vínculo de pareja establecido entre una hembra y un macho (Insel, 1997). La búsqueda de proximidad y la respuesta ante la separación, son fenómenos comunes que se presentan en todos los tipos de vínculo antes mencionados, sin embargo, las causas y consecuencias para obtener la proximidad varían de acuerdo al tipo de asociación. Las relaciones sociales antes descritas se presentan también en la especie humana y por ello el uso de modelos animales que despliegan estas conductas es útil para la elucidación de las bases neurobiológicas de este proceso, que ya se ha demostrado que tiene repercusiones directas en el bienestar fisiológico (Kawachi y Berman, 2001).

El estudio de los comportamientos afiliativos en los humanos es de gran relevancia para el estudio de la conducta humana. A través del uso modelos animales, se han descrito los efectos positivos de la afiliación y el apoyo social en la función y respuesta del sistema inmunitario.

En los humanos, las bases neurobiológicas que sustentan la resolución de conflictos y en consecuente el mantenimiento de la cohesión de un grupo social, no han sido elucidadas y es otro de los estudios que se ha llevado a cabo en animales que se reconcilian después de un encuentro agresivo (Hau et al; 2004).

1.2 Impacto del vínculo de pareja en humanos en la salud.

La teoría del apego descrita por Bowlby; proporciona un marco teórico en donde explica como las formas de amor sanas y no sanas se originaron en respuesta a una forma de adaptación ante las circunstancias sociales, establece la relación existente entre la soledad y el amor y finalmente liga el amor adulto con procesos social y emocional (Hazan y Shaver, 1987).

Las relaciones sociales se pueden evaluar a través de tres aspectos y cada uno tiene repercusiones en la salud a través de distintos mecanismos. El apoyo social; que se refiere a una provisión dentro de una red social, de recursos materiales y psicológicos con el objetivo de beneficiar las habilidades individuales para el manejo del estrés. La integración social; que se define como la participación en un rango amplio de relaciones interpersonales con el objetivo de mantener un compromiso activo y establecer el sentido de comunidad identificando las relaciones sociales intrapersonales (House et al; 1988). Por último; la interacción negativa, que incluye una serie de acciones ejecutadas por un individuo dentro de una red social que causan angustia a otros miembros que pertenecen a este mismo núcleo (Lincoln, 2000). Las consecuencias a la salud de estos tres factores han sido explicadas a través de dos modelos principales: 1) El modelo del buffer de estrés, en el que solo los individuos que se encuentran bajo condiciones estresantes resultan beneficiadas a través de un vínculo social (Rook, 1984; Kawachi y Berkman, 2001). El estrés promueve respuestas conductuales para el manejo del mismo, que producen un detrimento a la salud, entre ellas: el consumo de tabaco y alcohol, pérdida de sueño, uso de somníferos y otras. Además, promueve la activación de sistemas fisiológicos, tales como: el sistema nervioso simpático y el eje cortical hipotálamo- pituitario-adrenal. La activación prolongada y repetida de estos sistemas aumenta el riesgo en los individuos de desarrollar desórdenes físicos y psiquiátricos (Kawachi y Berkman, 2001; DeVries et al; 2003).

Y 2) El modelo de efectos principales, en donde las relaciones sociales tienen un efecto benéfico en los individuos, cuando estos se encuentren o no en condiciones de estrés.

En la siguiente tabla se presenta la interacción de estos modelos y los aspectos sociales considerados con anterioridad.

Constructo social	Mecanismo	Proceso específico
Apoyo social	Disminución de estrés	Eliminación o reducción de los efectos del estrés, a través de: la promoción de interpretaciones “menos amenazantes” de eventos adversos y adquisición de estrategias para el manejo experiencias estresantes.
Integración social	Efecto principal (independiente del estrés)	Promueve estados psicológicos positivos (identidad, propósito, autoestima y afecto positivo) que inducen respuestas fisiológicas que mejoran la salud. Provee información y es una fuente de motivación y presión social para el cuidado de otros.
Interacciones negativas	Relaciones sociales como una de fuente estrés	Potenciación del estrés psicológico y en consecuente las concomitantes fisiológicas que incrementan el riesgo de enfermedad.

Tabla 1. Mecanismos a través de los cuales los diferentes constructos sociales repercuten en la salud física de los individuos.

Dentro de las relaciones sociales y procesos de apego, se encuentra el amor romántico adulto, que se experimenta de diversas formas en cada individuo.

El concepto de amor proporcionado por Bowlby; involucra emociones positivas, tales como: cuidado, intimidad, confianza y emociones negativas; entre ellas: los altibajos emocionales, celos y miedo a la intimidad (Hazan y Shaver, 1987).

La manifestación del amor romántico y el establecimiento del vínculo de pareja después de un período de tiempo, se caracteriza por la expresión de ciertos síntomas que tienen repercusiones de manera física y psicológica en el individuo; entre estos destacan: atención especializada en el ser amado, anhelo, ansiedad, claro regocijo, euforia ante la presencia física o abstracta de la pareja, incremento del deseo de interacción y convivencia con la misma.

La interacción negativa o ausente con la pareja con la cual se estableció el vínculo afectivo, presenta consecuencias negativas en el sujeto afectado; tales como: crisis de llanto, somnolencia, ansiedad, insomnio, pérdida de apetito o compulsión por comer, irritabilidad y en casos extremos conductas socialmente riesgosas; entre ellas: acoso, persecución, suicidio y crímenes pasionales para la recuperación de la pareja seleccionada (Fisher et al; 2016).

La elección de pareja en la especie humana se establece con base en la respuesta de otros individuos a las necesidades personales.

El cuidado inadecuado durante la infancia es un factor predictor para conflictos en las relaciones de pareja (Hazan y Shaver, 1994) y dado que bajo el modelo de monogamia y amor romántico se establece un cuidado biparental; se ha demostrado que la progenie en una familia en donde existe la presencia de ambos padres bajo condiciones sociales sanas (poca presencia o ausencia de situaciones de angustia y estrés) presenta una mejor salud física y cognitiva (Burrone et al; 2012; Vezzetti,2016).

1.3 *Microtus ochrogaster* como modelo animal para el estudio del vínculo de pareja.

El concepto de monogamia, ha sido definido como un sistema de apareamiento y social. En el caso del primero la exclusividad sexual y de apareamiento es de suma importancia y el segundo se caracteriza por: su afiliación selectiva, altos niveles de cuidado paternal y un incremento de la agresividad hacia

extraños en defensa del territorio, nido o pareja (Young y Wang, 2004).

La especie *Microtus ochrogaster* es un mamífero socialmente monógamo, ya que exhibe las siguientes características: formación de vínculos de pareja entre machos y hembras de larga duración ; determinado por la preferencia de una pareja familiar y en algunos casos un comportamiento agresivo hacia un sujeto extraño, cuidado biparental, dimorfismo sexual reducido, supresión de la reproducción y evitación del incesto en la descendencia que permanece en la familia natal (Aragona y Wang, 2004; DeVries et al; 1995) . El reconocimiento de un familiar por parte de esta especie no se lleva a cabo de manera innata y requiere de contacto previo; no hay reconocimiento de alelos ni apareamiento fenotípico. En 1984, Gavish demostró que la evitación del incesto entre hermanos que han pasado poco tiempo juntos, en este caso 21 días (del nacimiento al destete); no se observa después de un período de aislamiento de ocho días, en comparación con hermanos que permanecieron juntos después del destete (cincuenta días) y que bajo el mismo período de aislamiento no produjeron crías (Gavish et al; 1984) . En conclusión en *Microtus ochrogaster* el reconocimiento de hermanos se basa en la proximidad dentro del contexto social en edad temprana, además de una asociación durante un período crítico (Paz y miñatno, 1999) .

El sistema social monógamo, ha sido observado en condiciones de laboratorio y en condiciones naturales. En estudios realizados en el campo las parejas de hembra y macho de topillos eran capturados juntos (Carter et al; 1995) y cohabitaban por largos períodos de tiempo (Young y Wang, 2004) . En 1986, Getz y Hoffman observaron que la unidad reproductora más común de estas especies estaba conformada por: una hembra, un macho y en su caso la progenie de ambos. Este grupo compartía nido y hogar durante períodos duraderos hasta que alguno de los miembros de la pareja moría; sin importar la época de reproducción o ausencia de la misma (Getz y Hofmann, 1986).

Uno de los fenómenos observados de gran relevancia refiere que cuando la densidad de población (relación entre un espacio determinado y el número de organismos que la habitan) era baja y estable, es

decir, que la tasa de natalidad era moderada y existía una distribución uniforme de sujetos de distintas edades; la monogamia fue observada en 71% de las familias capturadas, sin embargo, cuando la densidad de población era alta; se observó una disminución al 43% de familias monógamas, de estas el 31% estaban compuestas solo por una hembra reproductora, lo que sugirió que el macho que conformaba esta unidad familiar había muerto y el porcentaje restante estaba integrado por una hembra y un macho de la misma pareja reproductora (Carter et al; 1995).

El topillo macho, previo a la cópula, es un miembro altamente afiliativo de un grupo familiar multigeneracional que mantiene contacto social con extraños. Posterior a la cópula, el comportamiento se modifica; una de las consecuencias de la cópula es la formación de vínculo, en la que se requiere de la cohabitación por al menos 6 horas (Getz et al; 1981) y que en este período suceda el apareamiento (Getz et al; 1981; Carter et al; 2016). El topillo macho, una vez que estableció el vínculo de pareja, despliega conductas agresivas hacia intrusos conspecíficos, que han sido asociadas a un incremento en el número de células activas (Fos positivas) en la amígdala medial (Lim y Young, 2004) y se reflejan no sólo en la cantidad sino también en la cualidad de la agresión (Carter et al; 2016; Bester et al; 2015). Se ha descrito que hay un incremento en el comportamiento ofensivo (mordidas de ataque, amenazas laterales y empujes) , generalmente, hacia machos intrusos y una expresión de conductas defensivas (postura de defensa y respuestas de escape) hacia hembras intrusas; además de presentar solo comportamiento afiliativo hacia su pareja (Cho et al; 1999).

1.4 Conducta sexual

La conducta sexual, que ha sido caracterizada en el modelo de rata; presenta dos fases: la fase inicial o apetitiva seguida de la consumatoria (Beach, 1976). En la hembra, la fase inicial se caracteriza por los siguientes eventos: acercamiento de la hembra hacia el macho, orientación anogenital; que realiza la hembra para la posterior olfacción y acicalamiento por parte del macho, vibraciones rápidas de la cabeza que simulan el orejeo y el brincoteo (Pfaus et al; 1999). En el macho, la olfacción y la

investigación anogenital de la hembra, son característicos de la fase inicial (Agmo, 1997).

En la hembra, se presenta el reflejo de lordosis, que se caracteriza por el arqueamiento de la espalda y la extensión de las patas traseras junto con la elevación de la cabeza. En el macho, las conductas copulatorias se categorizan en tres grupos: montas; que refieren al abordaje de la hembra por parte del macho, intromisiones: en las cuales el macho presenta erección del pene y realiza una serie de inserciones en la vagina de la hembra y eyaculaciones; expulsiones de secreciones provenientes de la próstata y la vesícula seminal (Pfaus et al; 1999).

En los topillos hembra, el ciclo estral, la subsecuente ovulación y el comportamiento estral, no es un fenómeno que inicie en la pubertad como en la mayoría de los mamíferos. En esta especie se requiere la exposición a un macho no familiar, la orina de este o a una alta concentración de feromonas masculinas (quimioseñales) (Aragona y Wang, 2004).

1.5 Sistema olfatorio

El sistema olfatorio, ha sido relacionado con el comportamiento social en roedores y con la conducta sexual en otras especies de mamíferos. Los vertebrados poseen dos órganos nasales quimiosensitivos: el epitelio olfatorio principal (EOP) y el órgano vomeronasal (VNO) (Mombaerts, 2004), encargados de la detección de sustancias químicas volátiles y no volátiles, como las feromonas (Sokolowski y Corbin, 2012).

La información sensorial proveniente de estos órganos es recibida y procesada por el bulbo olfatorio accesorio (BOA), para el caso del VNO y por el bulbo olfatorio principal (BOP) para el caso del EOP (Sokolowski y Corbin, 2012). El VNO, el cual se localiza en la porción rostral de la cavidad nasal, posee neuronas sensoriales que se encuentran embebidas en un epitelio; éste a su vez recubre a un lumen lleno de moco secretado por las glándulas del VNO. Las feromonas entran en la cavidad nasal y se disuelven en este moco para alcanzar al VNO a través de ductos, que se encuentran en la base de la cavidad nasal. Las neuronas bipolares receptoras del VNO, extienden una dendrita simple a

las microvellosidades del lumen en la superficie apical; en este sitio es donde las feromonas interactúan con sus receptores. Los axones de las neuronas receptoras en el VNO se extienden a la capa glomerular del BOA, en donde hacen sinapsis con las dendritas de las células mitrales. Las proyecciones del BOA continúan a la amígdala media y al núcleo base de la estría terminal (BNST); este envía proyecciones al núcleo preóptico medial (mPN), a la porción ventrolateral del hipotálamo ventromedial (VMHvl) (Halem et al; 1999) y a los núcleos premilares nucleares (PMNv). El mismo circuito anatómico es el encargado del despliegue de conductas consumatorias (Agmo, 1997).

Las proyecciones desde el BOA y el BOP establecen sinapsis de manera directa o indirecta con diversas estructuras; entre ellas: la amígdala y la corteza piriforme. Las neuronas de la amígdala extienden sus axones hacia el hipotálamo, para la posterior integración y coordinación con el tallo cerebral (Sokolowski y Corbin, 2012).

La remoción completa de ambos bulbos olfatorios (incluyendo al VNO y núcleo anterior olfatorio) elimina la preferencia de pareja en hembras, ya que pasan menos tiempo en el compartimiento con el topillo macho con el que cohabitaron por 48 hrs (Williams et al; 1992); este fenómeno puede deberse a una menor exposición de señales olfatorias de topillos macho inductoras de ciclo estral durante este período. También se ha reportado, que la remoción de ambos bulbos olfatorios en los topillos hembra, afecta la expresión del comportamiento estral. La inducción de esta conducta se ve influida por el período de tiempo de cohabitación con el topillo macho; el 50% de las hembras con bulbectomía bilateral, que inicialmente no mostraron receptividad, mostraron altos niveles de lordosis después de 76 horas, sugiriendo que períodos más largos inducirían este fenómeno en todas las hembras utilizadas en este paradigma y que el sistema olfatorio no es esencial para el desarrollo de este fenómeno (Williams et al; 1992).

En topillos macho, la remoción de ambos bulbos olfatorios, disminuye el cuidado parental; efecto que no se observa en los topillos hembra (el cuidado parental es independiente del tratamiento hormonal).

Además se ha observado un decremento en el apareamiento, que correlaciona con la ausencia de investigación anogenital y montas hacia la hembra (Kirkpatrick et al; 1994).

Los topillos hembra y macho, pueden distinguir diferencias individuales en los olores de la orina y aserrín impregnado con secreciones, orina y heces fecales de conspecíficos y utilizan estas señales químicas para diferenciar a su pareja (Newman y Halpin, 1988; Unda et al; 2016;).

1.6 Neuroquímica del vínculo de pareja

La preferencia de pareja, que se define y determina en el laboratorio, como la elección y permanencia parcial del sujeto experimental por el compartimento donde se encuentra el cónyuge. . Esta es una de las características más importantes en la formación del vínculo de pareja (Aragona y Wang, 2004).

Los neuropéptidos: oxitocina (OT) y arginina vasopresina (AVP), se han propuesto como mediadores críticos en este comportamiento. *Microtus ochrogaster*, en comparación con especies no monógamas, presenta una alta densidad de receptores a OT en el caudatus putamen y el núcleo accumbens. En cuanto a los receptores a AVP 1a, se ha reportado alta densidad de estos receptores en el palidum ventral, la amígdala media y el tálamo mediodorsal; todas estas regiones involucradas en la formación del vínculo de pareja (Young y Wang, 2004).

La oxitocina, tiene un papel relevante en la modulación de las conductas socio-sexuales. La infusión intracerebroventricular de OT en ratas macho, aumenta el contacto social; la OT también favorece el cuidado maternal en ratas y ovejas hembra (38). La AVP, participa de manera directa en la defensa hacia el territorio en hámsteres macho y ambos neuropéptidos facilitan la consolidación de la memoria hacia individuos socialmente familiares (Insel, 1998).

La estimulación vagino-cervical en otros mamíferos incrementa la liberación de OT y se ha hipotetizado, que la cópula en los topillos, podría tener este efecto y así facilitar el vínculo de pareja. En topillos hembra que no copularon y en consecuencia no establecieron un vínculo de pareja, las cuales posteriormente recibieron una infusión intracerebroventricular de OT; mostraron preferencia de

pareja, lo cual como ya se describió es una de las características del vínculo afectivo (Young y Wang, 2004). Además, topillos hembra a las que se les administro un antagonista de los receptores a OT (d(CH₂)⁵-[Tyr(Me)₂,Thr₄,Try-NH]), previo a la cópula, no demostraron preferencia de pareja (Cho et al; 1999).

La OT, no presenta estos efectos en los topillos macho; pero es un neuropéptido fundamental para la formación de vínculo en topillos hembra (Young y Wang, 2004). Altos niveles de expresión de receptores a OT en los topillos hembra ha sido observada en la corteza prelímbica, la capa agranular de la corteza insular, la cápsula lateral del BNST, la porción rostral del cíngulo anterior y la porción postero-medial de la amígdala cortical. Por otro lado, la expresión moderada de estos receptores, fue observada en la porción ventromedial del núcleo anterior olfatorio, regiones ventrolaterales del VTA, en las porciones basolateral, central y lateral del núcleo amigdalino y en el tálamo ventral (Witt, 1991).

En los topillos macho, se ha reportado un decremento de las fibras AVP en el septum lateral (LS) y un incremento en el ácido ribonucleico (RNA) mensajero codificante para AVP en las células que proyectan hacia el LS, es decir, existe una relación directa entre la liberación sináptica de AVP y el incremento en la síntesis de AVP (Lim y Young, 2004). En ausencia de apareamiento, la administración de AVP en topillos macho, favorece: la preferencia de pareja, la agresión hacia conspecíficos no familiares y el cuidado paternal; todas estas conductas asociadas al establecimiento de vínculo (Aragona y Wang, 2004).

El bloqueo de receptores a AVP en topillos macho, tras la administración de un antagonista específico (d(CH₂)⁵[Tyr(Me)]AVP), inhibe la preferencia de pareja y la agresividad; aún en topillos macho que sí copularon (Bester et al; 2015).

1.7 Estudios de neurogénesis

La cópula, también ha sido relacionada con el proceso de neurogénesis; la formación de nuevas neuronas, Este es un proceso dinámico, que está regulado por diversos factores. La propuesta de que

este proceso tenía lugar después del período embrionario tuvo sus orígenes en el año de 1897, cuando Schaper demostró la existencia en el cerebro maduro de células indiferenciadas y planteó la posibilidad de que estas, podían dar lugar a neuronas (Gross,2000). No obstante, en 1965, aún se creía que la formación de neuronas del sistema nervioso central (SNC) de vertebrados superiores se presentaba sólo durante el desarrollo prenatal y no en etapas posteriores (período postnatal). El fundamento de esta creencia, se basaba en la ausencia de neuronas en el cerebro de aves y mamíferos en etapa adulta con figuras mitóticas, es decir, de elementos que precederían la división celular además de una falta de signos de proliferación neuronal regenerativa después de una lesión o trauma (Altman y Das, 1965).

Tras la administración de timidina tritiada en ratas jóvenes vía intracraneal y su posterior seguimiento, utilizando la técnica de autorradiografía, se observó que había una acumulación de granos de plata reducidos (radiación emitida por los átomos radiactivos desintegrados) sobre el núcleo de algunas neuronas en la neocorteza y sobre las células granulares del hipocampo. Este hallazgo indicaría síntesis de ácido desoxirribonucleico (DNA) y la posibilidad de neurogénesis (generación de neuronas nuevas) en algunas estructuras del prosencéfalo; aunque esto no involucraba demostración de función de las mismas. La incorporación de timidina marcada con un isótopo radiactivo, en este caso el tritio, es una medida proporcional a la proliferación celular (Altman y Das, 1965). La neurogénesis tardía en el hipocampo (a través de la migración de células no diferenciadas de los ventrículos hacia el hipocampo en dónde se diferencian), se realizó utilizando la incorporación de testosterona tritiada en células del hipocampo, sugiriendo que las “neuronas nuevas” expresaban receptores de hormonas gonadales (Balu y Lucki, 2009).

Fue hasta 1982, cuando se demostró que la neurogénesis podría ocurrir independientemente de la administración de tratamientos exógenos con testosterona. Utilizando canarios hembra adultos intactas a las cuales se les administró timidina tritiada por un período de dos días, y previo a esta administración algunas recibieron implantes de testosterona y otras de colesterol; se evaluó la

neurogénesis. Cinco semanas después de la implantación, los animales fueron sacrificados y se observó un incremento de: neuronas, glía, células endoteliales y células de la zona ventricular alrededor del hiperestriado ventral (HVc). Esta estructura, se ha relacionado a la masculinización del canto en las hembras a través de la administración de testosterona. Las aves tratadas con colesterol y testosterona, presentaron índices de marcaje muy similares en el rango de 1.8% a 4% en HVc, indicando que el proceso de neurogénesis ocurre en estos animales adultos independiente al tratamiento hormonal. En este estudio, se concluyó, que las neuronas marcadas con timidina tritiada localizadas en el núcleo HVc; eran resultado de: la proliferación, migración y diferenciación neuronal de células precursoras de la zona ventricular. El mecanismo para este proceso involucraría células precursoras que dan origen a células troncales y neuroblastos (Goldman y Nottebohm, 1983).

En 1998, con la introducción del BrdU (5'- 2' bromo deoxiuridina), un análogo de timidina, se demostró que la neurogénesis ocurría en humanos adultos, en regiones previamente estudiadas en otras especies, como el giro dentado en el hipocampo (Eriksson et al. 1998). En el año 2000, se establecieron los principales nichos neurogénicos en el animal adulto; los cuales son: la zona subgranular (ZSG) del hipocampo y la zona subventricular (ZSV) de la pared lateral del ventrículo. Las células troncales neurales residen en la porción anterior de la ZSV y migran como neuroblastos a través de la vía migratoria rostral hacia el BO, en donde se integran como interneuronas inhibitorias periglomerulares (Ming y Song, 2011).

Las células troncales neurales que se encuentran en el giro dentado del hipocampo, concretamente en la ZSG, proliferan y se diferencian, para luego integrarse en la zona granular en donde maduran hasta convertirse en neuronas excitatorias (Arzate et al; 2013).

En el topillo de la pradera, se ha demostrado este proceso plástico; en áreas como: el área preóptica media, la amígdala, el cuerpo estriado, la neocorteza y el hipotálamo (Ming y Song, 2011).

1.8 Neurogénesis en el bulbo olfatorio

En las paredes laterales de los ventrículos laterales del cerebro adulto, se localiza la ZSV, que es de carácter altamente germinal (Álvarez y García, 2002). La ZSV, que se origina a partir de progenitores residuales de la eminencia gangliogénica lateral (LGE), es una de las capas germinales principales durante la embriogénesis, que da lugar a la mayoría de las neuronas y células gliales en el prosencéfalo. En etapas tardías del desarrollo embrionario, la ZSV genera células destinadas a los ganglios basales adyacentes y otras estructuras del cerebro; incluyendo: el diencéfalo y la corteza (Young et al; 2007). A diferencia de otras zonas germinales, la ZSV permanece después del nacimiento y en la mayoría de los mamíferos en la etapa adulta, las neuronas nuevas que se originan en esta región, migran a través de la vía migratoria rostral (VMR) hasta el BO en donde maduran a células granulares y periglomerulares (Álvarez y García, 2002) .

En los roedores, el proceso de neurogénesis no finaliza cuando el BO alcanza el tamaño adulto, por el contrario, continúa a lo largo de toda la vida.

Las células neurales troncales que se encuentran dentro de la ZSV; son un grupo distinto de astrocitos que expresan la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y que exhiben ciertas propiedades de la glía radial. Estas células precursoras son conocidas como células tipo B (Young et al; 2007); por su carácter multipotente de progenitor neural, producen cúmulos de precursores inmaduros de rápida división o células de tipo C, que a su vez dan origen a neuronas que producen la molécula de adhesión celular ácido polisiálico,, también conocidas como células de tipo A o neuroblastos (Sui, 2012).

Los derivados de las zonas germinales del prosencéfalo; consisten en dos capas celulares de distinta morfología que rodean los ventrículos laterales: la endpendima y la subependima. Las células endpendimales, que forman una capa celular simple multiciliada que reviste a los ventrículos y se encuentran proximales a las células de la ZSV, han sido caracterizadas como células troncales, ya que expresan el marcador celular la prominina -11/CD133 (Pignatelli y Belluzi, 2010).

Los precursores celulares expresan diversos marcadores celulares que no son exclusivos de una célula de tipo troncal. Por ello, los marcadores han sido divididos en dos categorías: “universales” o marcadores celulares generales, que definen las características biológicas de las células tipo- troncales. Dentro de esta categoría, se encuentra la nestina, la cual se expresa de manera específica en precursores celulares neurales. La segunda categoría, corresponde a los antígenos presentados durante el ciclo celular, que son usados como marcadores de proliferación celular; entre ellos: la proteína nuclear ki-67 y el antígeno de proliferación nuclear celular (PCNA) (Pignatelli y Belluzi, 2010).

Las neuronas inmaduras provenientes de estos precursores celulares, se caracterizan por la expresión de marcadores neuronales tempranos, como la proteína de unión a RNA (Hu). Otros marcadores utilizados son la β tubulina clase III (TuJ1), la proteína del citoesqueleto; expresada en todas las neuronas postmitóticas, la doblecortina (DCX) y otros (Whitman y Greer, 2009). Terminando el proceso de diferenciación, las neuronas maduras presentan antígenos; como: la enolasa específica de neuronas (NSE), la proteína nuclear específica neuronal (NeuN) y la proteína asociada a microtúbulos (MAP- 2).

Aproximadamente el 50% de las células adultas nacientes que migran al BO experimentan muerte celular programada; tales como: progenitores, neuroblastos y células neuronales jóvenes en la ZSV, VMR o BO (Pignatelli y Belluzi, 2010; Whitman y Greer, 2009).

Las neuronas nuevas generadas en la etapa adulta dependen de la estimulación sensorial, se ha demostrado que después del cierre de las fosas nasales, se observa un incremento en la muerte celular y la neurogénesis disminuye (Pfisterer y Khodosevich, 2017). Por el contrario, la estimulación sensorial a través de la exposición a odorantes novedosos incrementa la neurogénesis en esta región (Veyrac et al; 2009)

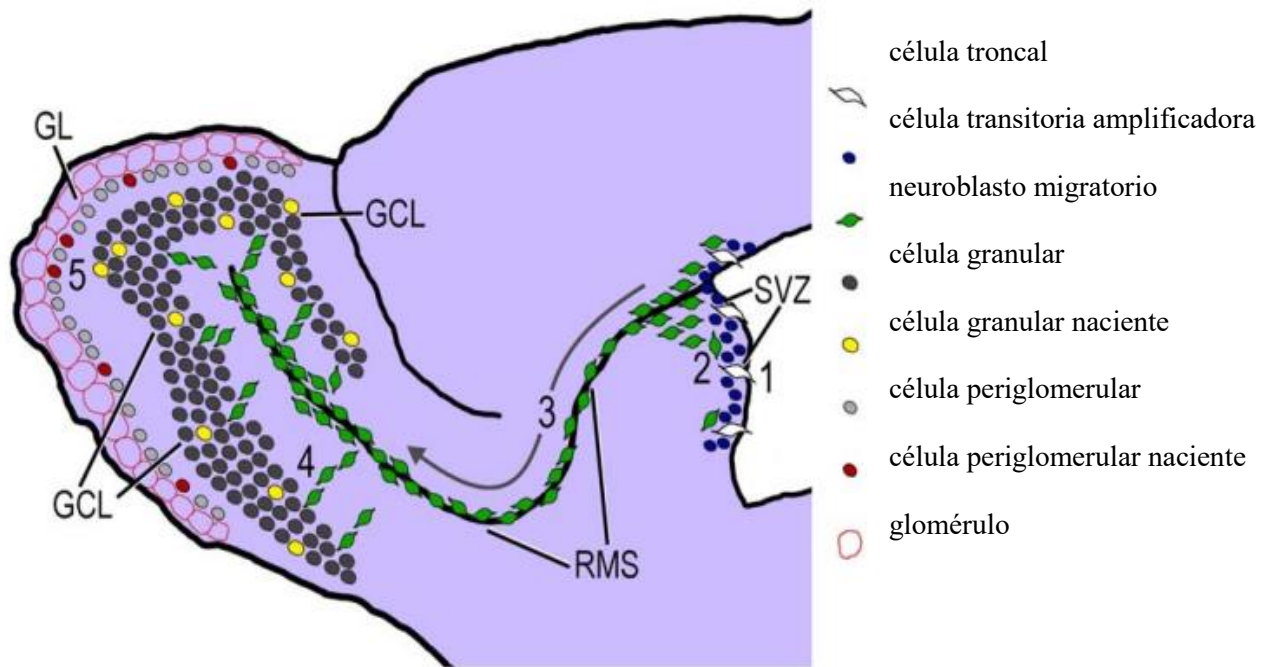


Figura 1. Neurogénesis en la ZSV y el BO en un roedor adulto. 1) Las células troncales proliferan principalmente en la ZSV; en donde: se diferencian (2) a neuronas inmaduras neuroblastos) Posteriormente, realizan una migración tangencial de neuroblastos a través de la VMR hacia el BOP (3); este proceso se lleva a cabo entre 2 y 6 días. Después, las células realizan una migración radial (5-7 días después del nacimiento (4) hacia las capas: granular, periglomerular y plexiforme externa del BO (5), 15–30 días después del nacimiento de las células troncales, se presenta la maduración para la formación de interneuronas locales en el BO. que despliegan arborizaciones dendríticas extensivas. Tomado y modificado de (Sui, 2012).

1.9 Relación entre Conducta sexual/formación de vínculo y neurogénesis

Como ya se mencionó, el proceso de neurogénesis está modulado por diversos estímulos; de tipo: fisiológico, patológico y farmacológico.

Smith y colaboradores demostraron, que en los topillos hembra, el ciclo estral se presenta de manera inducida tras la exposición de señales quimiosensoriales de un macho no familiar. Este proceso, mediado por la olfacción, se ve reflejado en un incremento en los niveles de estrógeno en el suero y la consecuente inducción de receptividad sexual. Smith, evaluó si la exposición a un macho incrementa la

proliferación celular.; n este estudio topillos hembra ovariectomizadas y sin reemplazo hormonal, fueron expuestas a un macho y no presentaron la inducción del ciclo estral, tampoco un incremento del estrógeno en el suero, además de que no se observó un aumento las células nuevas (BrdU+) en la VMR. Por el contrario, las hembras ovariectomizadas y suplementadas con estradiol, a las cuales se les indujo receptividad sexual a través de la exposición a un macho no familiar, mostraron un aumento de las células BrdU+ en la porción anterior de la ZSV en comparación con las hembras expuestas a una hembra. El 80% de estas células mostraron un fenotipo de tipo neuronal en la VMR, demostrando que posiblemente los cambios antes mencionados estén mediados por el estrógeno (Smith et al; 2001)

Los efectos de la cópula sobre la neurogénesis adulta también fueron evaluados por Leuner, quien demostró que la neurogénesis en el hipocampo en ratas macho incrementaba significativamente después de la cópula y este incremento se pudo observar después de la exposición única o múltiple a ratas hembra sexualmente receptivas (Leuner et al; 2010).

Nuestro grupo, demostró que en la rata, la exposición a olores de carácter sexual y no sexual; como el acetato de amilo (aroma a plátano), incrementa significativamente la proliferación celular en la ZSV. También se observó un aumento en la densidad de células nuevas en la en la región anterior de la VMR, en las hembras que copularon, sin importar si regulaban o no la cópula (Corona et al; 2016).

Otro estudio de nuestro grupo evaluó si la cópula regulada promueve la llegada de neuronas nuevas en el BOP y BOA en ratas hembra adultas. Demostramos que 15 días después de la cópula, se incrementa el número de células nuevas que llegan a la capa granular del BOA; estas células pueden participar en la detección y discriminación de señales sexuales olfatorias (Corona et al; 2011). Respecto a la supervivencia celular, una sola estimulación sexual no modificó la supervivencia de las células nuevas que se integran en las capas del BOP y el BOA, sin embargo, el número de neuronas nuevas en la división anterior del BOA fue más alto en aquellas hembras que copularon regulando o no la interacción sexual, sugiriendo que el comportamiento sexual influye sobre el destino neuronal de las

células que sobreviven en la capa granular del BOA. Estos resultados podrían sugerir que las células nuevas en el BO, en particular las células granulares, aportan plasticidad sináptica con una mayor respuesta a odorantes y una mayor sensibilidad a olores nuevos, en comparación con las células granulares preexistentes; debido a que dentro de la población de neuronas granulares del BO nacientes, existe un grupo de estas células que expresan genes de expresión temprana en respuesta a olores novedosos (Corona et al; 2016).

En otro estudio, nuestro grupo de trabajo demostró que el número de células nuevas (algunas de estas identificadas como neuronas) incrementó en la capa granular del BOA quince días después en ratas macho que eyacularon una o tres veces controlando la interacción sexual (paced mating) (Portillo et al; 2012). Posterior a este estudio, se evaluó si la conducta sexual en ratas macho incrementa la densidad de neuronas nuevas que sobreviven cuarenta y cinco días después de la conducta sexual en el BOA y en el BOP; encontrándose que los machos que eyacularon tres veces muestran un incremento en la densidad de células nuevas en la parte posterior de la capa granular en el BOA y un número más alto de células nuevas se diferenciaron a neuronas en comparación con los machos control (Unda et al;2016).Por ello, se ha propuesto que las neuronas nuevas participan en la transducción de señales de circuitos relacionados con la cópula y en la memoria olfativa, por lo que la formación de vínculo de pareja, podría estar mediada por la neurogénesis.

2. ANTECEDENTES

Las conductas reproductivas: el cortejo, la cópula y la conducta parental, constituyen la categoría más importante de las conductas sociales y se caracterizan por ser sexualmente dimórficas (Neil, 1996). Para el estudio de estas conductas y por la facilidad de su manejo, se han utilizado roedores: ratas y ratones, que muestran comportamientos socialmente estereotipados; asociados con: la reproducción, el cuidado maternal y la agresión. Sin embargo, estos modelos de estudio no presentan la formación de vínculo de pareja, que se define como: una relación estable entre los miembros de una pareja

reproductora, que cohabitan y despliegan conductas parentales por más de una estación reproductiva (Aragona y Wang, 2004). En los humanos, se ha demostrado que la formación de vínculos de pareja tiene repercusiones en la salud física y mental de los individuos. Se ha reportado que individuos: solteros, divorciados, separados y viudos, en comparación con aquellos en una relación estable de pareja, tienen niveles mayores de ansiedad y depresión; además de un alto nivel de mortalidad asociado con: enfermedades coronarias, infartos, neumonía, diversos tipos de cáncer, cirrosis hepática, homicidios, accidentes de auto y suicidios (House et al; 1998; Ross et al; 1990).

La incapacidad para formar vínculos socialmente estables, ha sido una característica común de desórdenes mentales; tales como: la depresión, ansiedad, autismo y esquizofrenia (Ross et al; 1990). Los mecanismos de plasticidad neuronal involucrados en la formación de vínculos de pareja no han sido bien esclarecidos, por lo que en el presente estudio, pretendemos contribuir a la comprensión de los mismos.

Para el estudio de la monogamia social, la formación de vínculos pareja y otros aspectos de cognición social, fue necesaria la identificación de un modelo animal que permitiera elucidar los mecanismos biológicos de estas conductas socialmente complejas. La especie *Microtus ochrogaster* o topillo de la pradera, cumple con este criterio; al ser altamente afiliativa, desplegar un comportamiento biparental y formar vínculos socialmente duraderos (Young y Wang, 2004).

Uno de los posibles mecanismos biológicos implicados en la formación de vínculo de pareja es la neurogénesis. El proceso de neurogénesis no es estático, ya que depende de la estimulación interna y externa que reciben los individuos (Peretto y Paredes, 2014).

En este trabajo, evaluaremos si la conducta sexual/ formación del vínculo de pareja, incrementa el número de células nuevas en: el BO, el APM, la AMG y el HVM en hembras y machos de la especie *Microtus ochrogaster*.

3. JUSTIFICACIÓN

La formación de relaciones sociales duraderas y el desarrollo de vínculos de pareja son críticos para la salud mental y física de cada uno de los miembros de la pareja. Se ha demostrado, que en *Microtus ochrogaster*, la cópula induce la formación de un vínculo de pareja y al ser esta una conducta reproductiva que modula la neurogénesis, se pretende evaluar si la formación del vínculo y la neurogénesis están estrechamente relacionadas.

4. HIPÓTESIS

En el macho y en la hembra, formación de vínculos de pareja a través de la cópula, incrementará la llegada de células nuevas en el BOA, el BOP, la AMG, el APM y HVM, las cuales se diferenciarán a neuronas funcionales.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar si la cópula y la formación de vínculos de pareja incrementa la neurogénesis en el BOA, el BOP, la AMG, el APM y el HVM en *Microtus ochrogaster*.

5.2 Objetivos particulares

- Cuantificar el coeficiente de lordosis (número de respuestas de lordosis/ número de montas).
- Registrar: el número, los movimientos pélvicos y la latencia de: montas, intromisiones y eyaculaciones, además del intervalo posteyaculatorio de los topillos macho.
- Evaluar el número de células nuevas en el BO, la AMG, el APM y el HVM.
- Determinar si las células nuevas expresan un marcador de diferenciación neuronal en las regiones antes mencionadas.

6. Material y métodos

6.1 Sujetos de estudio

Los sujetos utilizados fueron topillos de la pradera (*Microtus ochrogaster*) sin experiencia sexual

previa. Los animales fueron obtenidos mediante una colaboración con el Dr. Larry Young de la Universidad Emory, Atlanta. Los animales originales fueron capturados cerca de Urbana, Illinois. Los machos y hembras nacidos en el bioterio del Instituto de Neurobiología en Juriquilla, Querétaro, fueron mantenidos bajo ciclos de luz y oscuridad (14 horas luz/10 horas de oscuridad) con una temperatura de 21 ± 1 °C y fueron destetados a los 21 días de edad. Los sujetos del mismo sexo (4-6) se colocaron en cajas de acrílico (29 X 18 X 13) que contenían una cama de aserrín. El alimento provisto fue comida para conejos (Rabbit Chow, Purina Lab Chows, Cat 5321), avena y semillas de girasol y agua *ad libitum*.

Posteriormente, los animales fueron asignados aleatoriamente a los siguientes grupos; cada uno formado por 16 sujetos, 8 parejas: a) control; sujetos que no copularon ni fueron expuestos a claves sensoriales de animales del sexo opuesto; b) exposición; topillos que recibieron claves sensoriales de un animal del sexo opuesto pero no tuvieron contacto físico y c) cópula/formación de vínculo; roedores que copularon. Las pruebas conductuales tuvieron una duración de 6h.

Todas las técnicas son utilizadas de forma rutinaria y los protocolos han sido aprobados por el comité local de bioética.

Para controlar el estado hormonal y la receptividad sexual, todas las hembras fueron ovariectomizadas. La cirugía se realizó bajo la administración previa de una mezcla de anestésicos; xilazina al 2% y ketamina 0.1g/mL en vehículo de solución salina. Después de dos semanas de recuperación, fueron remplazadas hormonalmente por la administración s.c por 4 días consecutivos de benzoato de estradiol (10 µg/kg, disuelto en aceite de maíz). Este procedimiento consistentemente induce receptividad sexual en esta especie (Smale et al; 1985). Los machos fueron gonadalmente intactos.

6.2 Estudios de neurogénesis

Para identificar a las células nuevas, se utilizó el marcador de síntesis de ADN (BrdU; Sigma: St. Luis, MO). Se preparó una solución stock de BrdU en NaCl 0.9% a una concentración de 100 mg/ ml y

posteriormente se administró intraperitonealmente, 5 minutos antes del inicio de la prueba y se repitió su administración cada 120 minutos durante 6 horas, con un total de 3 inyecciones por animal. Estudios previos han demostrado que para la formación del vínculo en los topillos se requieren al menos 6 horas de cohabitación con al menos 2 sesiones de cópula en este intervalo (Gray y Dewsbury, 1973).

6.3 Conducta sexual y formación de vínculo de pareja.

Las parejas designadas para la cópula, se colocaron en cajas de acrílico, como las descritas anteriormente (una pareja por cada caja) y durante un periodo de 6 horas, se observó el comportamiento sexual; registrando: a) en hembras; el coeficiente de lordosis (reflejo que se caracteriza por la postura de arqueamiento de la columna vertebral que facilita el alineamiento genital entre ambos miembros de la pareja) que se evalúa como la proporción entre el número de lordosis en respuesta a el número de montas y b) en machos: el número, la latencia y cantidad de movimientos pélvicos durante las montas, intromisiones y eyaculaciones. Además se registró el intervalo post eyaculatorio (la eyaculación es comúnmente seguida de un autoacicalamiento, después del cual el macho entra en un período de inactividad sexual, y algunas veces de una inactividad general (Smith et al;2001).

Las parejas designadas en el grupo de exposición, se colocaron en cajas de acrílico por 6 horas (una pareja por cada caja); estas cajas presentan en la parte media una división, que consiste en una malla de acrílico con orificios regulares, la cual permite la cohabitación mediada por la detección de: estímulos olfativos, auditivos, visuales y táctiles; pero no permite la cópula ni el contacto directo de los sujetos involucrados.

En el grupo control, los sujetos se colocaron de manera individual (aislados) en las cajas descritas.

Durante la prueba conductual, los animales tuvieron libre acceso a la comida y agua.

6.4 Perfusión cerebral/fijación

Los animales fueron sacrificados 15 días después de la administración de BrdU, para lo cual fueron anestesiados con pentobarbital sódico y perfundidos vía la aorta ascendente, usando solución buffer de PBS 0.1M pH 7.2, seguido de 4% de paraformaldehído en PBS.

Los cerebros se extrajeron y se fijaron por una hora en paraformaldehído al 4% y después se almacenaron en una solución de sacarosa al 30%. Posteriormente, se realizaron cortes (de manera sagital en el BO y coronal en el resto de las estructuras) de las regiones neuronales de interés: el BO, la AMG, el HVM y el APM.

Todas las secciones cerebrales se almacenaron en solución de anticongelante hasta la realización de la inmunohistoquímica.

6.5 Inmunohistoquímica de BrdU.

Las secciones cerebrales fueron lavadas con buffer salino Tris (TBS), con una duración de 10 minutos por lavado. Posteriormente, se incubaron 15 minutos con TBS y borohidrato de sodio al 0.5%. Se realizó un segundo lavado con TBS y se incubaron durante 30 minutos en solución de TBS al 1 % de Tritón X (TX)- 100 y peróxido de hidrógeno al 1%. Transcurrido este tiempo, las muestras se incubaron por 10 minutos con TBS y dimetil sulfoxido (DMSO) al 1% y se lavaron nuevamente con TBS por 10 minutos.

Las secciones fueron incubadas en ácido clorhídrico (HCl) 2N, por treinta minutos a 37° C y se lavaron con TBS por diez minutos. Posteriormente, fueron incubadas con TBS y borohidrato de sodio al 0.5% por 15 minutos, se lavaron nuevamente con TBS y se incubaron por 30 minutos en solución de TBS con , albúmina al 10% y TX al 0.3%. Las muestras fueron incubadas por 16 horas a 4°C con el anticuerpo monoclonal de rata anti BrdU (Accurate Serotec Chemical Rat MAB Anti BrdU OBT0030 AXYLL 1:1000).

Transcurrido este tiempo, se realizó un lavado con TBS y TX al 0.02% durante 10 minutos, se incubaron con el anticuerpo secundario anti-rata IgG biotinilado (1:250 Vector BA-9400) en TBS,

albúmina al 1% y TX al 0.02% por dos horas. Se realizó un lavado con TBS y TX al 0.02% por 10 minutos y se incubaron en el complejo de avidina y biotina (ABC) en TBS y TX al 0.32% por 90 minutos. Se realizó un lavado con TBS y posteriormente, se incubó con diamino bencidina (DAB) por no más de diez minutos. Las muestras recibieron un lavado final con TBS y fueron montadas en portaobjetos tratados con gelatina y cubiertos con un cubreobjetos utilizando Permount (Fisher Scientific, USA). Las muestras se analizaron con un microscopio de luz Olympus.

6.6 Inmunofluorescencia de BrdU y NeuN

Las secciones cerebrales fueron lavadas con PBS, con una duración de 10 minutos por lavado. Las secciones fueron incubadas en HCl 2N por treinta minutos a 37° C y se lavaron tres veces con PBS. Posteriormente fueron lavadas con PBS y TX al 1%, se realizó una incubación con H₂O₂ al 1% y se lavaron tres veces con PBS por diez minutos. Se realizó un primer bloqueo con caseína al 0.5% durante treinta minutos. Posteriormente, las muestras fueron incubadas por 16 horas a 4°C con el anticuerpo monoclonal de rata anti BrdU (Accurate Serotec Chemical Rat MAB Anti BrdU OBT0030 AXYLL 1:1000) en PBS y caseína al 0.05%. Transcurrido este tiempo, se realizaron tres lavados con PBS y TX al 0.1% durante 10 minutos, se realizó un segundo bloqueo con caseína al 0.05% y se adicionó el anticuerpo secundario anti-rata IgG biotilado (1:1000 Vector BA-9400) en caseína por dos horas. Después, se incubaron en solución de ABC en PBS por 60 minutos. Se realizó un lavado con PBS y TX al 0.02% y se incubó con el sistema de amplificación de tiramidas utilizando cumarina (1:100 por diez minutos). Se realizaron tres lavados con PBS y se dejaron en esta solución toda la noche a 4°C. Se continuó con un tercer bloqueo con caseína, seguido por la incubación del anticuerpo monoclonal de ratón anti NeuN (Millipore 1:1000) en caseína y se realizaron tres lavados con PBS y TX al 0.1% durante 10 minutos. Las muestras se incubaron en solución de ABC en PBS por 60 minutos y realizó un lavado con PBS y TX al 0.02% , seguido de la incubación con el sistema de cyanina 3

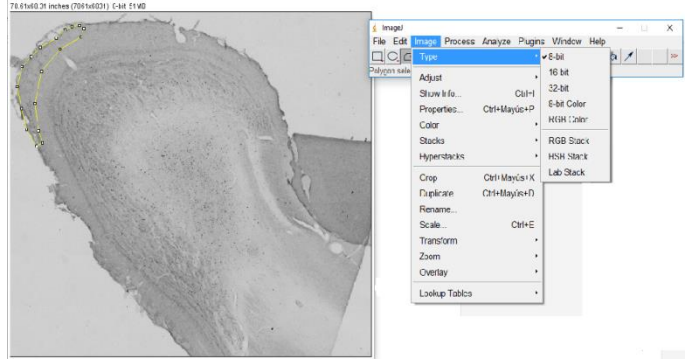
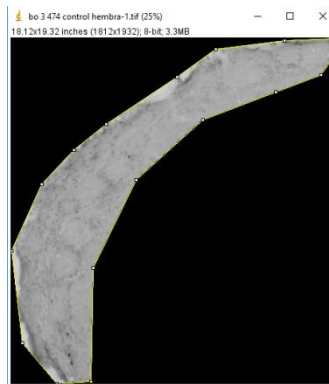
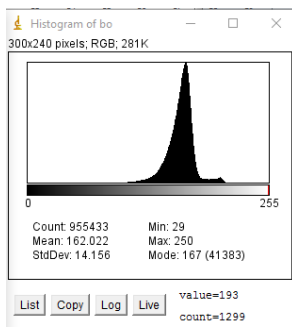
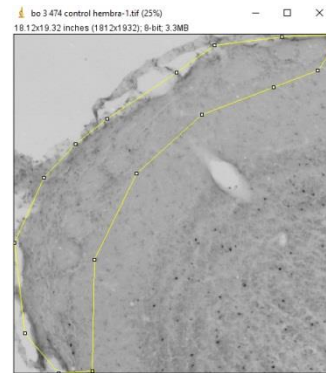
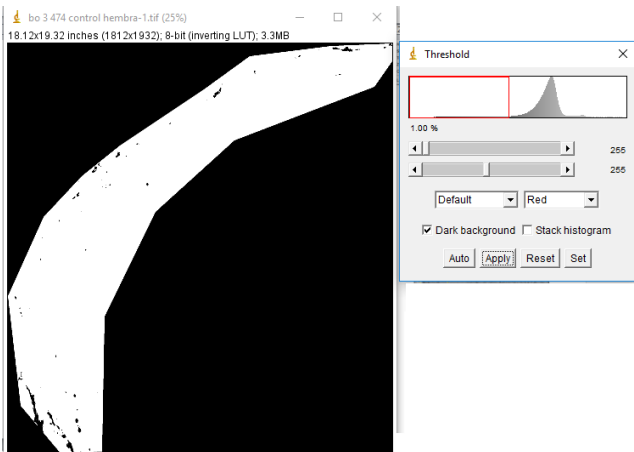
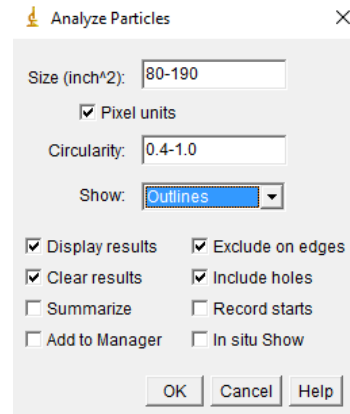
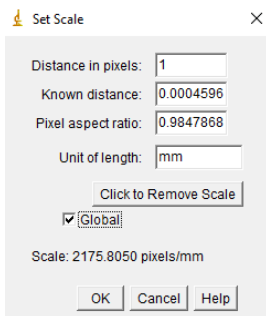
(1:100) por diez minutos. Se realizaron tres lavados con PBS y se incubaron en PBS toda la noche a 4°C. Una vez terminado el proceso las muestras fueron montadas utilizando Aquamount para cubrirlas (Hitobiotec). Las muestras fueron analizadas en el microscopio confocal Zeiss LSM 700.

6.7 Análisis microscópico y cuantificación de las células marcadas con BrdU utilizando DAB como revelador.

Después de llevar a cabo las inmunohistoquímicas, se localizó y cuantificó las células inmunoreactivas. Las células BrdU+, en las que la detección del antígeno se realizó utilizando DAB, fueron analizadas realizando una reconstrucción en el eje X, Y utilizando un microscopio de luz Olympus BX60 con un objetivo 20X.

Para la determinación del número de células BrdU+, se utilizó el software Imagen J, en donde se asignaron las áreas de interés (AOI). Las señales quimiosensoriales activan de manera selectiva subpoblaciones celulares que se localizan en las distintas partes del BOA (Dudley y Moss, 1999). Por ello la capa granular del BOA se dividió en dos secciones: anterior y posterior; la activación de estas áreas depende del tipo de señal odorífera que reciben, en este caso de odorantes y feromonas provenientes de la orina (Dudley y Moss, 1999). La exposición a componentes volátiles de la orina de ratas hembra activa la región anterior del BOA y la parte caudal de la región posterior del mismo en ratas macho. La estimulación con componentes volátiles de la orina de ratas macho, activa la región anterior en ratas macho y hembra, no obstante, la exposición con componentes no volátiles provenientes de las ratas hembra activan preferentemente la región posterior del BOA (Portillo et al; 2012).

Las AOI seleccionadas para el conteo en las capas granular y glomerular del BOP fueron realizadas en la zona apical. Se contaron 3 rebanadas de cada estructura en cada animal. Las AOI del resto de las estructuras se realizaron solo en el hemisferio derecho.

A**B****E****D****C****G****F****G****J****I****H**

Results					
File	Edit	Font	Results		
	Area	Mean	Min	Max	%Area
1	0.009	255	255	255	100
2	0.015	255	255	255	100
3	0.012	255	255	255	100
4	0.012	255	255	255	100

K

Results

File	Edit	Font	Results			
	Area	Mean	Min	Max	%Area	
1	0.009	255	255	255	100	
2	0.015	255	255	255	100	
3	0.012	255	255	255	100	
4	0.012	255	255	255	100	
5	0.738	186.778	0	255	73.246	

Figura 2. Representación del conteo celular automático realizado con el software Image J; tomado y modificado de Image J user guide y Two ways to count cells with Image J de Christine Labno, Universidad de Chicago. A) Micrografía representativa del BO mostrando células inmunoreactivas a BrdU; reconstrucción tomada con objetivo 20X de un corte sagital de un sujeto experimental. El antígeno BrdU fue revelado con DAB. **B)** Ajuste en la escala de grises de la micrografía original. **C)** Magnificación y selección del AOI, esta imagen corresponde a la zona apical de la capa glomerular del BOP. **D)** Delimitación del AOI. **E)** Histograma que muestra la distribución de los valores en escala de grises en el AOI. **F)** Ajuste del umbral en la escala del canal rojo. **G)** Parámetros a utilizar que indican el tamaño celular en pixeles y la circularidad. **H)** Tabla que indica el número de células que cumplen con las condiciones establecidas. **I)** Sobrelape de los contornos de las células en la imagen original. **J)** Ajuste de la escala de medida de pulgadas cuadradas a milímetros cuadrados y **K)** Tabla que muestra el tamaño del área seleccionada.

6.8 Análisis microscópico y cuantificación de nuevas neuronas

Después de llevar a cabo la inmunofluorescencia, se realizó el análisis requerido para localizar y cuantificar las células inmunoreactivas a BrdU y NeuN. La detección de estos antígenos, se realizó utilizando distintos fluoróforos: cumarina y cianina, respectivamente. Las imágenes fueron analizadas realizando una reconstrucción en el eje X, Y, Z utilizando un microscopio confocal ZEISS LSM 700 con un objetivo 20X.

Para la determinación del número de nuevas neuronas, se utilizó el software ImageJ, en donde se asignaron las áreas de interés (AOI), se seleccionaron las células BrdU+ y NeuN+ y se visualizó el corte ortogonal. Las AOI se seleccionaron de igual forma que el análisis realizado con el microscopio de luz.

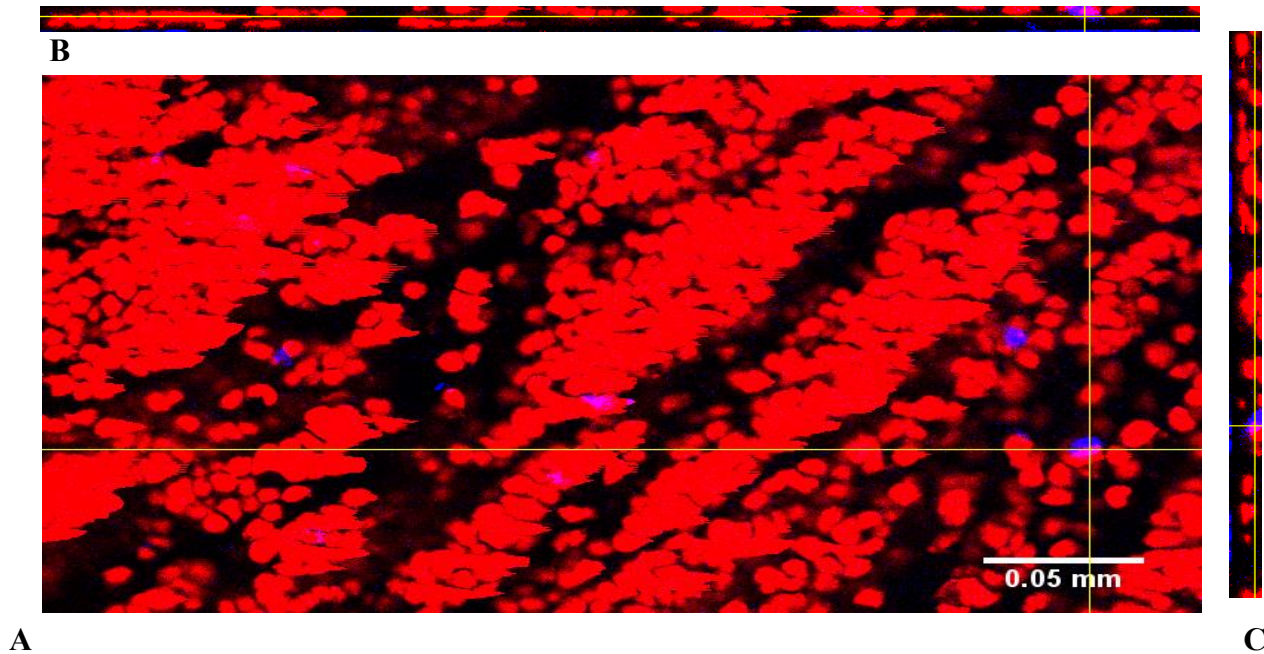


Figura 3. Cortes ortogonales (XY, XZ y YZ) de un Z stack. (A) Plano XY (proyección z). NeuN (rojo) + BrdU (azul). (B) Plano XZ. (C) Plano YZ. Escala: 50µm

6.9 Análisis estadístico

Se utilizó el software Sigma Plot 11.0 para el análisis estadístico. Los datos obtenidos de los conteos de células BrdU+ revelados con DAB y fluorescencia no pasaron la prueba de normalidad, por lo que se realizó un ANOVA en rangos, tomando como diferencia estadísticamente significativa un valor de $p \leq 0.05$, para la comparación de las tres condiciones experimentales en el mismo sexo. Para la comparación entre ambos sexos, bajo la misma condición experimental, se realizó una U de Mann Whitney tomando como diferencia estadísticamente significativa un valor de $p \leq 0.05$.

De los tres cortes seleccionados por estructura de cada animal se realizó un promedio de los conteos y posteriormente se obtuvo la mediana del número de de animales por grupo experimental.

7. Resultados

7.1 Parámetros de la conducta sexual

Los parámetros sexuales analizados, pertenecen a la fase consumatoria del comportamiento sexual. Los topillos hembra, no presentan ciclo estral y el comportamiento asociado a este período es inducido por la presencia de un macho no familiar o por la estimulación con señales quimiosensoriales. La receptividad sexual de las hembras fue evaluada mediante el coeficiente de lordosis.. En la tabla 2 se muestran los valores obtenidos de los parámetros conductuales cuando los machos copularon por 24 horas. Los datos muestran, que los machos copularon consistentemente durante la duración de la prueba, de manera similar a la observado en nuestro grupo de trabajo (Ulloa et al en preparación). Los topillos hembra, presentaron altos niveles de receptividad como se muestra en el coeficiente de lordosis registrado en la tabla 3..

Tabla 2. Determinación de los parámetros de la conducta sexual para los topillos macho utilizados en el grupo de cópula. Se muestra la latencia de monta (LM) de intromisión (LI) y de eyaculación (LE) en segundos (s), el número de montas (NM) e intromisiones (NI), el intervalo posteyaculatorio (IP) y el intervalo inter-intromisión (II) registrados durante seis horas.

Topillo macho	LM (s)	NM	LI (s)	NI	LE (s)	IP (s)	II (s)	NE
66	67	145	1532	141	1631	552	11,6	6
479	331	213	581	166	982	104	5,9	6
477	319	177	386	223	1369	1161	6,1	5
481	274	312	802	176	1471	252	8,4	7
480	379	126	669	202	1123	534	5,6	7
483	222	117	972	143	1293	590	9	6
1	90	110	157	449	758	514	1,68	7
2	165	113	454	691	3019	862	4,36	6
Media	115,08	69,70	421,80	195,82	689,80	329,06	3,05	6,25
Error estándar de la media	40,69	24,64	149,13	69,23	243,88	116,34	1,08	0,25

Tabla 3. Coeficiente de lordosis (LQ) registrado en los topillos hembra del grupo de cópula.

Topillos hembra	LQ (%)
91	61,9
73	56,2
29	72,8
58	63,9
60	78
59	64,2
1	63,2
2	59,8
Media	65
Error estándar de la media	2,50

7.2 Estandarización de la inmunohistoquímica contra BrdU revelada con DAB

La detección del marcador de síntesis de DNA (BrdU), se realizó a través de inmunohistoquímica revelada con DAB. Las siguientes micrografías, fueron obtenidas utilizando una cámara EM00411 acoplada a un microscopio Olympus BX60. Todas las imágenes fueron tomadas con la magnificación de 20X. Se seleccionó una porción de cada área de estudio en cada animal en la orientación rostro-caudal.

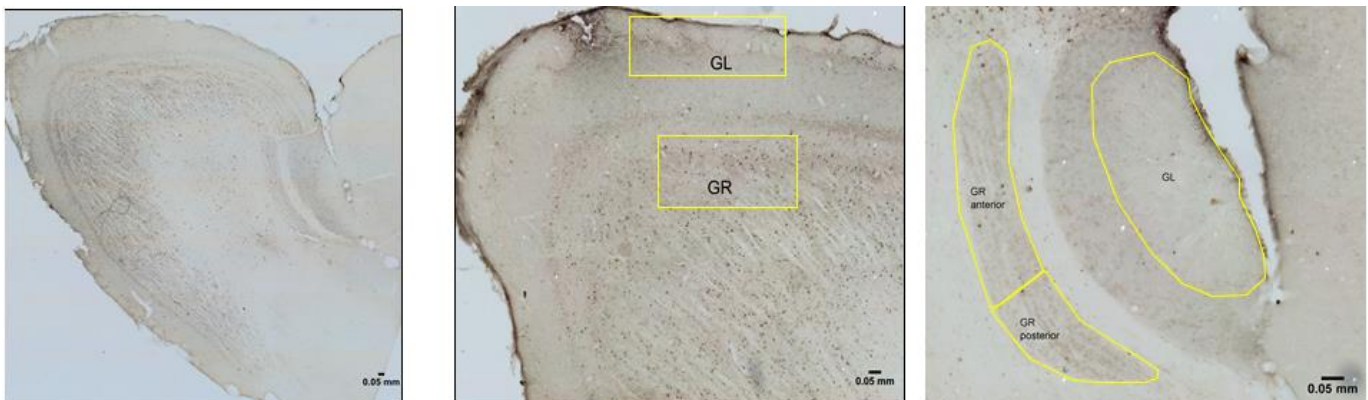


Figura 3. Sección sagital del BO (30 μ m) de un topillo macho nacido de una madre inyectada con BrdU

por tres días consecutivos, iniciando la administración el día 13 de la gestación y concluyéndolo el día 15. Se muestra la inmunoreactividad hacia el antígeno BrdU. Los polígonos amarillos señalan la capa granular y glomerular del BOP y BOA. La capa granular del BOA se dividió en la sección anterior y posterior. En café se pueden observar las células que incorporaron BrdU, como se observa, la inmunoreactividad se presenta en todas las regiones señaladas.

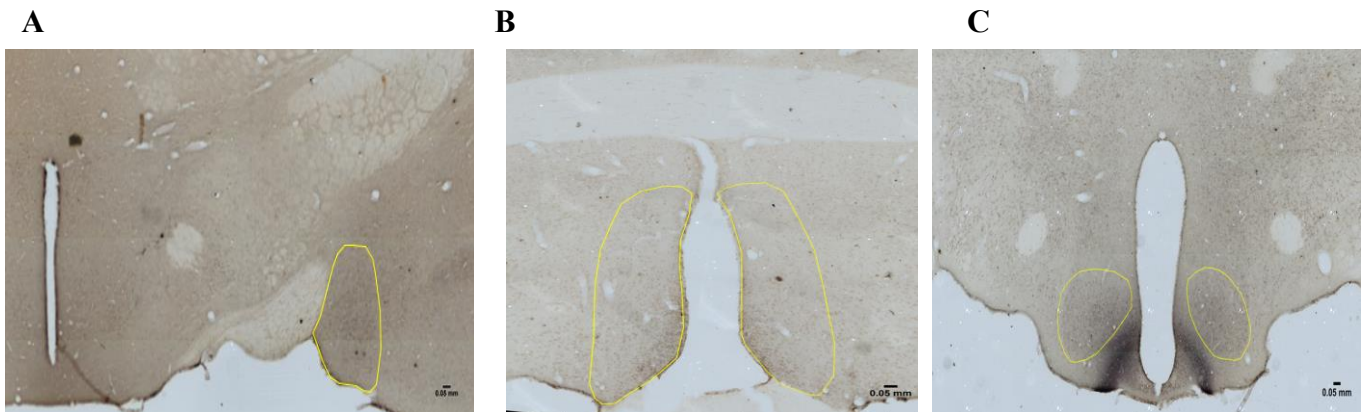


Figura 4. Secciones coronales de la AMG (A), el APM (B) y el HVM (C) (30 μ m de espesor) de un topillo macho nacido de una madre inyectada con BrdU por al menos siete días, iniciando la administración el día 14 de la gestación. Se muestra la inmunoreactividad hacia el antígeno BrdU. Los polígonos amarillos señalan el área seleccionada para realizar el conteo celular.

7.3 Estandarización de la inmunohistoquímica contra BrdU y NeuN revelada con fluorescencia

Para llevar a cabo el conteo de neuronas nuevas, se realizó la detección del marcador de síntesis de DNA nuevo BrdU y del marcador neuronal NeuN a través de inmunohistoquímica.. Las siguientes micrografías fueron obtenidas utilizando el microscopio confocal LSM700 y con la magnificación de 20X. Se seleccionó una porción de cada área de estudio en cada animal en la orientación rostro-caudal. En la figura 5 se muestra en rojo la proteína nuclear (NeuN) y en azul el marcador de proliferación celular (BrdU).

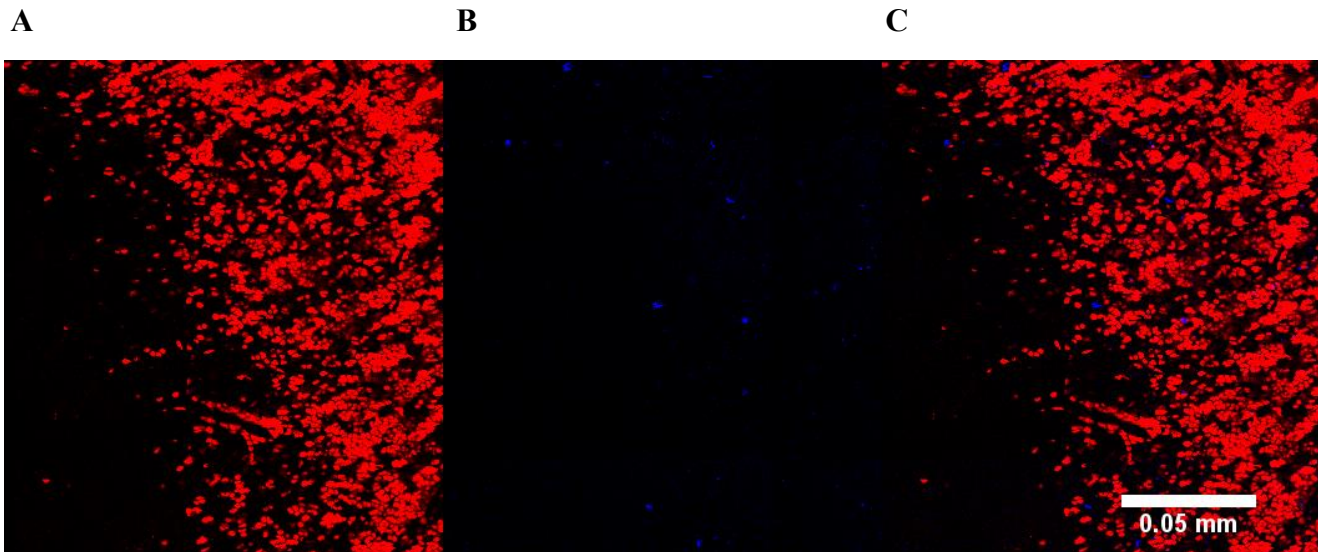


Figura 5. Micrografía fluorescente de un animal utilizado como control positivo. Se muestra una porción de la capa granular de la sección sagital del BOP. La proteína nuclear, NeuN, se observa en color rojo al ser revelada con cianina (A) y el análogo de timidina, BrdU, en azul al ser revelado con cumarina (B).

El sobrelape de ambos marcadores se observa en (C).

Para ambos revelados, se utilizaron dos controles negativos: el primero; se realizó utilizando cortes de BO de un animal al cual no se le administró BrdU y el segundo; se realizó con un animal al cual se le administró BrdU; pero durante la inmunohistoquímica no se le añadió el anticuerpo monoclonal de rata

anti BrdU. Fotomicrografías no mostradas.

7.4 Células BrdU+ reveladas con DAB

La determinación del número de células nuevas, evaluado con la expresión del antígeno BrdU, como una medida proporcional a la proliferación, fue realizada en distintas capas del BOP y BOA; en este último, la capa granular fue dividida en: sección anterior y posterior; en la AMG, el APM y el VMH. Los siguientes gráficos, muestran los conteos automáticos de células nuevas por milímetro cuadrado, en topillos hembra y macho. La prueba estadística realizada fue un análisis de varianza en rangos de una vía Kruskal Wallis (KW) para la evaluación de las tres condiciones experimentales en el mismo sexo, y la U de Mann Whitney para la comparación entre ambos sexos, bajo la misma condición experimental. En el gráfico 1, se muestra el número de células BrdU positivas en la capa granular del BOP. No se encontraron diferencias significativas entre los machos ($H = 1,140$, $gl\ 2$, $p = 0,566$) ni en las hembras ($H = 2,495$, $gl\ 2$, $p = 0,287$). La comparación entre ambos sexos, tampoco resultó significativa en esta región y en ninguno de los tres grupos experimentales: control ($T=82$, $p = 0,161$), exposición ($T=74$, $p= 0.574$) y vínculo ($T=69$, $p=0.959$).

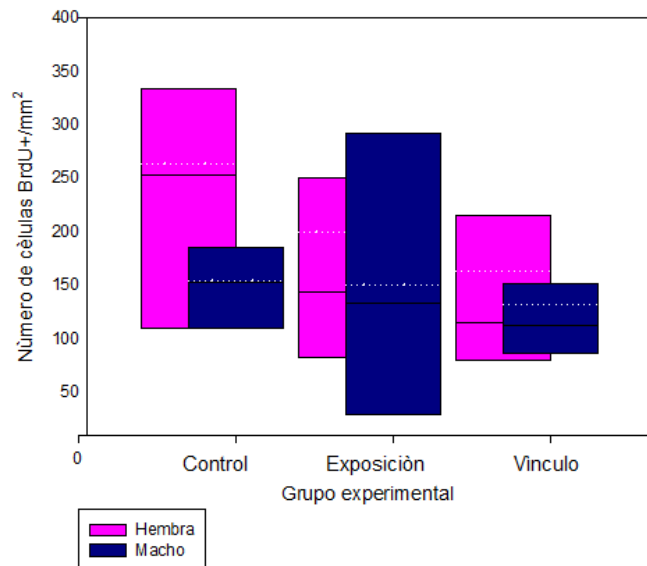


Gráfico 1. Número de células BrdU+ /mm² en la capa granular del BOP en los topillos hembra y macho. Se muestran las medianas y los percentiles correspondientes 5 y 95 y para cada grupo. Se realizó

un ANOVA en rangos para el análisis estadístico. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los topillos hembra ($p = 0,287$) ni entre los topillos macho ($p = 0,566$). Se realizó una U de Mann Whitney para las comparaciones entre ambos sexos dentro de los mismos grupos experimentales. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre ambos sexos bajo alguna condición experimental ($p > 0.05$).

En el gráfico 2, se muestra el número de células nuevas en la capa glomerular del BOP, en los distintos grupos experimentales en los topillos hembra y macho. La comparación efectuada entre las distintas condiciones experimentales y el mismo sexo no fue estadísticamente diferente en las hembras ($H = 0,635$, $gl\ 2$, $p = 0,728$) y en los machos ($H = 1,235$, $gl\ 2$, ($p = 0,539$). No hubo diferencias estadísticamente significativas en la comparación entre ambos sexos bajo ninguna condición experimental: control ($T=67$, $p= 0.959$), exposición ($T= 76$, $p=0.442$) y vínculo ($T=72$, $p = 0.721$).

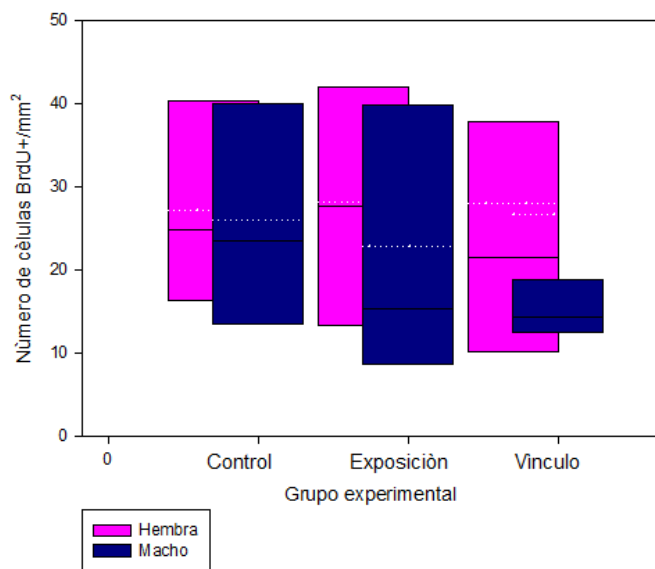


Gráfico 2. Número de células BrdU+ /mm² en la capa glomerular del BOP en los topillos hembra y macho. Se muestran las medianas y los percentiles correspondientes 5 y 95 y para cada grupo. Se realizó un ANOVA en rangos para el análisis estadístico. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los topillos hembra ($p = 0.728$) ni entre los topillos macho ($p = 0,539$). La

comparación entre ambos sexos bajo el mismo grupo experimental, tampoco resultó estadísticamente diferente ($p > 0.05$).

Como se mencionó anteriormente, la capa granular del BOA fue dividida en dos secciones: anterior y posterior. En el gráfico 3, se representa el número de células BrdU+ / mm² en la sección anterior. En la comparación efectuada en los distintos grupos de las hembras, se observó diferencia estadísticamente significativa entre grupo control y el grupo de vínculo ($H = 7,265$, gl 2, $p = 0,026$). Para el caso de los machos, no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($H = 0,341$, gl 2, $p = 0,843$). De igual forma, la comparación entre hembras y machos bajo la misma condición experimental, no resultó estadísticamente significativa en: el grupo control ($T = 83$, $p = 0.130$), exposición ($T = 61$, $p = 0.505$), y vínculo ($T = 62$, $p = 0.574$).

En el gráfico 4, se muestra el número de células BrdU+/mm² en la sección posterior de la capa granular del BOA. No se observó diferencia estadísticamente significativa en los grupos experimentales de los topillos hembra ($H = 5,386$, gl 2, $p = 0,068$). Los grupos experimentales de los topillos macho tampoco resultaron estadísticamente diferentes entre sí ($H = 0,36$, gl 2, $p = 0,833$). La comparación entre los topillos hembra y macho, bajo la misma condición experimental, no presentó diferencia estadísticamente significativa en: el grupo control ($T = 84$, $p = 0.105$), exposición ($T = 59$, $p = 0.382$) y vínculo ($T = 66.5$, $p = 0.878$).

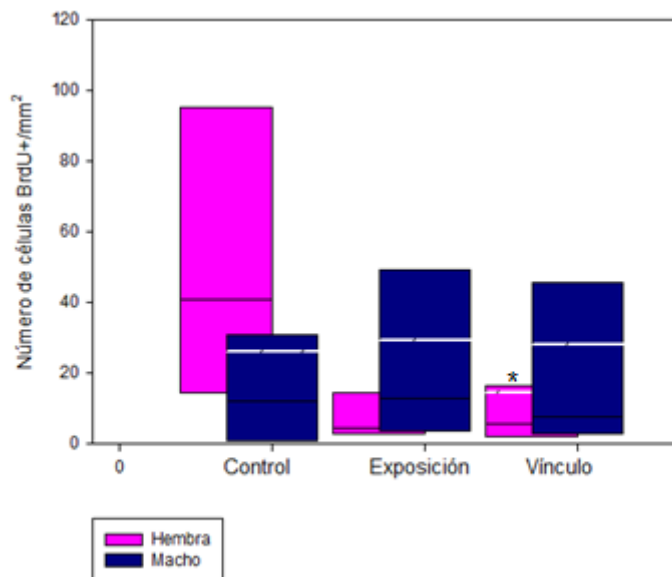


Gráfico 3. Número de células BrdU+ /mm² en la capa granular (sección anterior) del BOA en los topillos hembra y macho. Se muestran las medianas y los percentiles correspondientes 5 y 95 y para cada grupo. Se realizó un ANOVA en rangos para el análisis estadístico. En las hembras el grupo control y el grupo de vínculo es estadísticamente diferente y se señala esta diferencia con * (p = 0,026). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los topillos macho (p = 0,843). La comparación entre ambos sexos bajo las misma condición experimental tampoco resulto estadísticamente diferente (p >0.05).

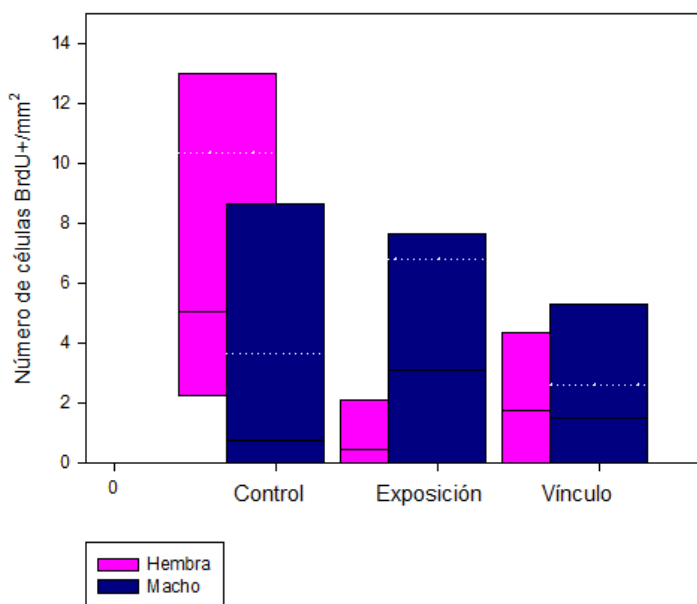


Gráfico 4. Número de células BrdU+ /mm² en la capa granular (sección posterior) del BOA en los topillos hembra y macho. Se muestran las medianas y los percentiles correspondientes 5 y 95 y para cada grupo. Se realizó un ANOVA en rangos para el análisis estadístico. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los topillos hembra (p = 0,068), ni entre los topillos macho (p = 0,833). La comparación entre ambos sexos del mismo grupo experimental tampoco resulto estadísticamente diferente (p>0.05).

El número de nuevas células también fue evaluado en la capa glomerular del BOA en topillos hembra y macho. Dentro de los grupos experimentales de las hembras no se presentó diferencia estadísticamente

significativa ($H = 0,945$, gl 2, $P = 0,623$). Así mismo, los grupos experimentales de los machos no resultaron estadísticamente diferentes ($H = 1,385$, gl 2, $P = 0,500$). No hay diferencia estadísticamente significativa entre hembras y machos del mismo grupo experimental, control ($T = 68$, $p = 1.0$), exposición ($T= 69$, $p= 0.959$) y vínculo ($T=64$, $p = 0.721$).

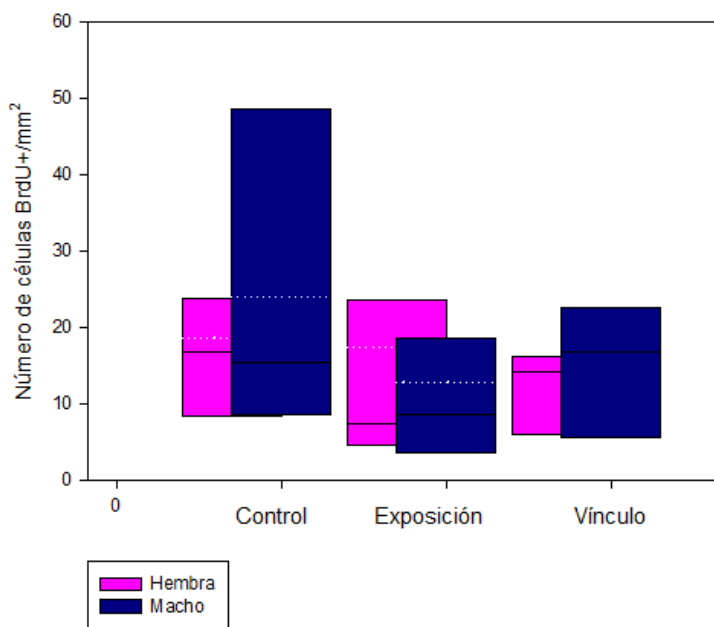


Gráfico 5. Número de células BrdU+ /mm² en la capa glomerular del BOA en los topillos hembra y macho. Se muestran las medianas y los percentiles correspondientes 5 y 95 y para cada grupo. Se realizó un ANOVA en rangos para el análisis estadístico. Las hembras del grupo control y el grupo de vínculo presentaron diferencia estadística ($p = 0,623$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los topillos macho ($p = 0,500$). La comparación entre ambos sexos del mismo grupo experimental tampoco resultó estadísticamente diferente ($p > 0.05$).

En la AMG, el APM y el HVM también se efectuó la comparación del número de células nuevas en los topillos hembra y macho. En el gráfico 6, se muestran los conteos celulares en todos los grupos experimentales en la AMG. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos de las hembras ($H = 0,612$, gl 2, $p = 0,736$) ni entre los distintos grupos de los machos ($H = 3,844$, gl 2, $p = 0,146$). La comparación entre hembras y machos bajo la misma condición experimental

no presentó diferencia estadísticamente significativa: control (T=65, p = 0.798), exposición (T =80, p =0.234) y vínculo (T= 73, p= 0.645).

En el gráfico 7, se muestran los conteos celulares en todos los grupos experimentales en el APM. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos de las hembras (H = 0,307, gl 2, P = 0,858) ni entre los distintos grupos de los machos (H = 0,208, gl 2, P = 0,901). La comparación entre hembras y machos dentro del mismo grupo experimental no presentó diferencia estadísticamente significativa: control (T=64, p =0.721), exposición (T = 69, p = 0.959) y vínculo (T=61.5, p = 0.505).

En el HVM, sólo 4 animales presentaron proliferación celular que correspondían: al grupo control macho, al grupo de exposición de hembra, al grupo vínculo hembra y al grupo vínculo macho. No se muestra el gráfico.

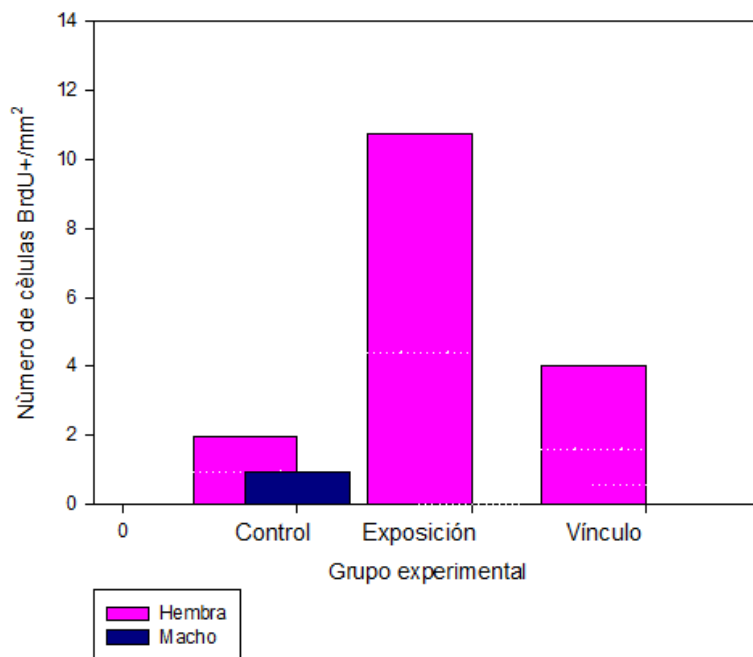


Gráfico 6. Número de células BrdU+ /mm² en la AMG en los topillos hembra y macho. Se muestran las medianas y los percentiles correspondientes 5 y 95 y para cada grupo. Se realizó un ANOVA en rangos para el análisis estadístico, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los topillos

hembra ($p = 0,858$), ni entre los topillos macho ($p = 0,901$). La comparación entre ambos sexos dentro del mismo grupo experimental tampoco resultó estadísticamente diferente ($p > 0.05$).

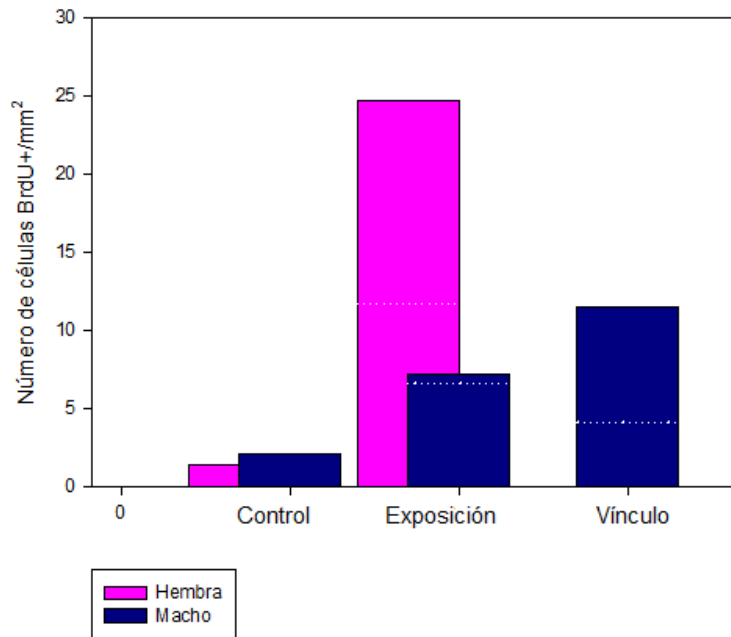


Gráfico 7. Número de células BrdU+ /mm² en el APM en los topillos hembra y macho. Se muestran las medianas y los percentiles correspondientes 5 y 95 y para cada grupo. Se realizó un ANOVA en rangos para el análisis estadístico. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los topillos hembra ($p = 0,736$), ni entre los topillos macho ($p = 0,146$). La comparación entre ambos grupos tampoco resultó estadísticamente diferente ($p > 0.05$).

7.5 Células BrdU+ reveladas con fluorescencia

El número de células nuevas también fue determinado utilizando un método de amplificación enzimática mediado por tiramida. Como ya se mencionó, la expresión del antígeno BrdU, es un indicador de síntesis de DNA nuevo y fue utilizado como una medida proporcional a la proliferación celular. Los conteos se realizaron en las mismas áreas que en el revelado con DAB.

Los gráficos siguientes, muestran los conteos manuales de células nuevas por milímetro cuadrado en topillos hembra y macho. La prueba estadística realizada fue un análisis de varianza en rangos de una vía

Kruskall Wallis (KW) para la evaluación de las tres condiciones experimentales en el mismo sexo, y la U de Mann Whitney para la comparación entre ambos sexos, bajo la misma condición experimental. En el gráfico 8, se muestra el número de células BrdU positivas en la capa granular del BOP. No se encontraron diferencias significativas entre los machos ($H = 1.095$, $gl\ 2$, $P = 0,578$) ni en las hembras ($H = 1.860$, $gl\ 2$, $P = 0,395$). La comparación entre ambos sexos, bajo la misma condición experimental, en esta región tampoco resulto significativa: control ($T=53$, $p = 0.130$), exposición ($T = 70$, $p = 0.878$) y vínculo ($T=73$, $p = 0.645$).

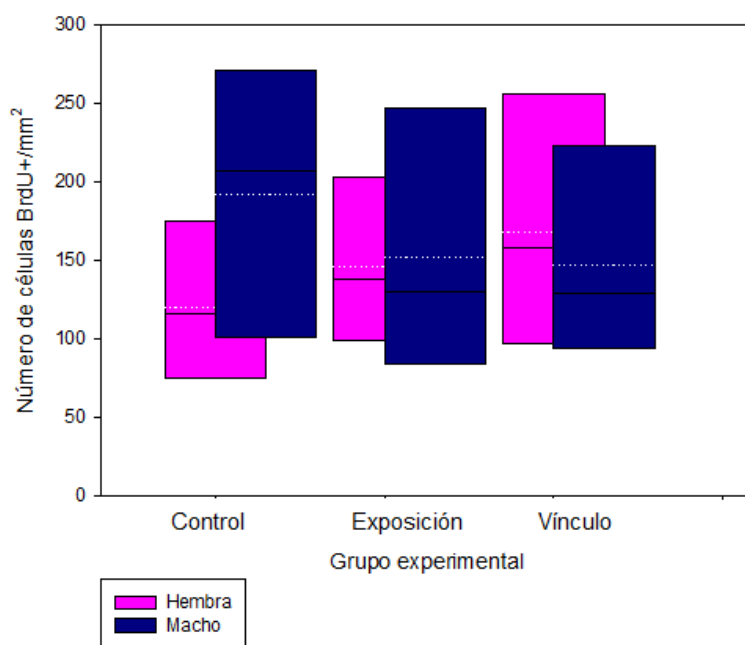


Gráfico 8. Número de células BrdU+ /mm² en la capa granular del BOP en los topillos hembra y macho. Se muestran las medianas y los percentiles correspondientes 5 y 95 y para cada grupo. Se realizó un ANOVA en rangos para el análisis estadístico. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los topillos hembra ($p = 0.395$) ni entre los topillos macho ($p = 0,578$). La comparación entre ambos sexos del mismo grupo experimental tampoco resulto estadísticamente diferente ($p > 0.05$).

El número de células nuevas en la capa glomerular del BOP, en los distintos grupos experimentales en los topillos hembra y macho, no fue estadísticamente diferente al realizar la comparación intra grupo, en las hembras ($H = 0,465$, $gl\ 2$, $P = 0,793$) y en los machos ($H = 3.375$, $gl\ 2$, $P = 0,185$). No hubo diferencias estadísticamente significativas en la comparación entre ambos sexos, bajo la misma condición experimental: control ($T= 56$, $p = 0.234$), exposición ($T= 67$, $p = 0.959$) y vínculo ($T= 66$, $p = 0.878$). Esta información se muestra en el gráfico 9.

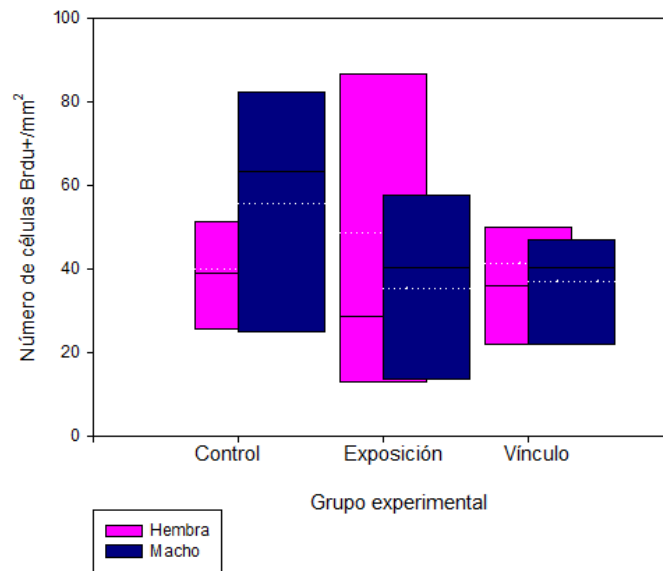


Gráfico 9. Número de células BrdU+ /mm² en la capa glomerular del BOP en los topillos hembra y macho. Se muestran las medianas y los percentiles correspondientes 5 y 95 y para cada grupo. Se realizó un ANOVA en rangos para el análisis estadístico. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los topillos hembra ($p = 0.793$) ni entre los topillos macho ($p = 0,185$). La comparación entre ambos sexos del mismo grupo experimental tampoco resultó estadísticamente diferente ($p > 0.05$).

Como se mencionó anteriormente, la capa granular del BOA fue dividida en dos secciones: anterior y posterior. En el gráfico 10, se representa el número de células BrdU+ / mm² en la sección anterior. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los topillos hembra ($H= 4.363$, $gl\ 2$, $p= 0.113$),

ni en los topillos macho ($H = 4.9401$, $gl\ 2$, $p = 0,085$). De igual forma la comparación entre hembras y machos bajo las misma condición experimental no resulto estadísticamente significativa: control ($T= 83$, $p = 0.130$), exposición ($T= 58$, $p =0.328$) y vínculo ($T=63$, $p = 0.645$).

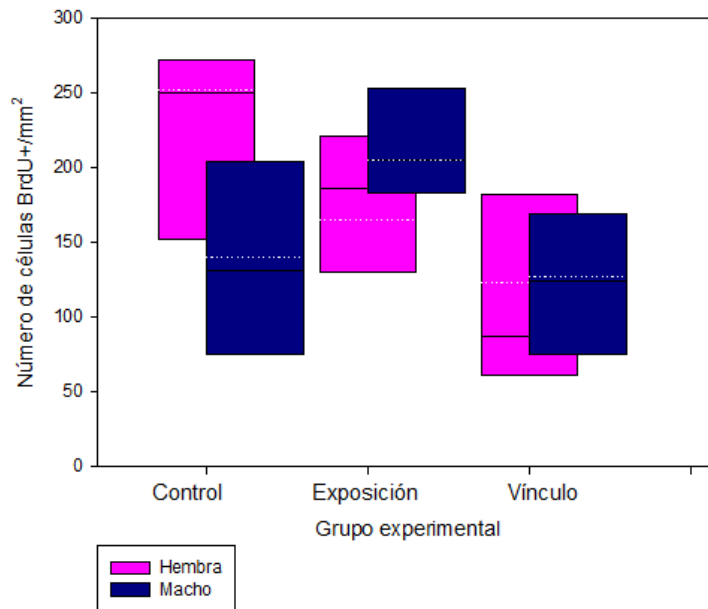


Gráfico 10. Número de células BrdU+ /mm² en la capa granular (sección anterior) del BOA en los topillos hembra y macho. Se muestran las medianas y los percentiles correspondientes 5 y 95 y para cada grupo. Se realizó un ANOVA en rangos para el análisis estadístico. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los topillos hembra ($p=0.113$) ni en topillos macho ($p = 0,085$). La comparación entre ambos sexos en dentro del mismo grupo experimental tampoco resulto estadísticamente diferente ($p>0.05$).

En el gráfico 11, se muestra el número de células BrdU+ /mm² en la sección posterior de la capa granular del BOA. No se observó diferencia estadísticamente significativa en los grupos experimentales de los topillos hembra ($H = 3.594$, $gl\ 2$, $p = 0,166$). Los grupos experimentales de los topillos macho tampoco

resultaron estadísticamente diferentes entre sí ($H = 0,380$, $gl\ 2$, $p = 0,827$). La comparación entre los topillos hembra y macho bajo la misma condición experimental no presentó diferencia estadísticamente significativa: control ($T= 74$, $p= 0.574$), exposición ($T= 72$, $p =0.721$) y vínculo ($T=58$, $p =0.328$).

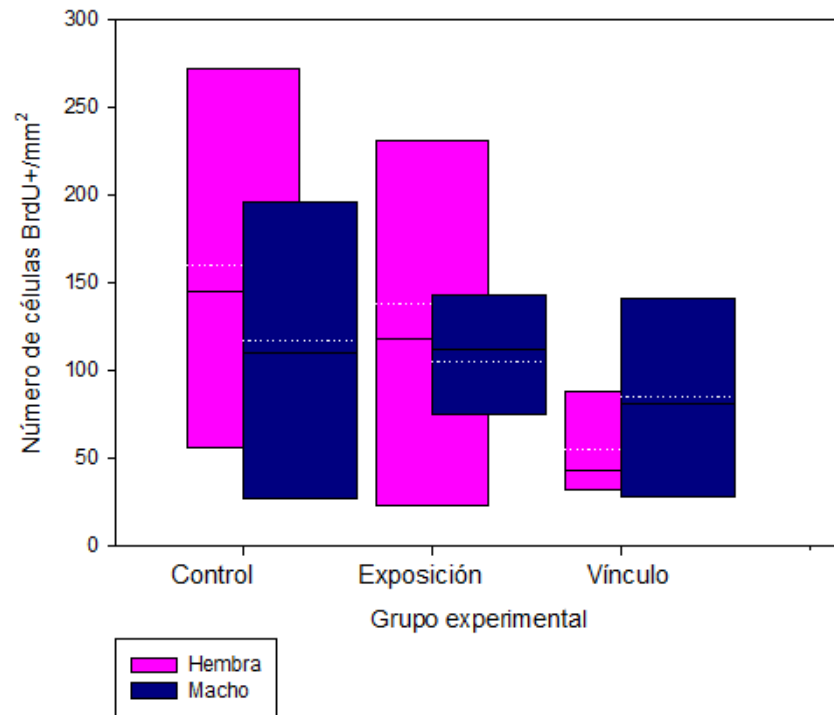


Gráfico 11. Número de células BrdU+ /mm² en la capa granular (sección posterior) del BOA en los topillos hembra y macho. Se muestran las medianas y los percentiles correspondientes 5 y 95 y para cada grupo. Se realizó un ANOVA en rangos para el análisis estadístico. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los topillos hembra ($p=0.166$), ni entre los topillos macho ($p=0.827$). La comparación entre ambos sexos dentro del mismo grupo experimental tampoco resultó estadísticamente diferente ($p>0.05$).

El número de células nuevas también fue evaluado en la capa glomerular del BOA en topillos hembra y macho. Dentro de los grupos experimentales de las hembras, se presentó diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control respecto al grupo de vínculo y de exposición ($H =7.633$, $gl\ 2$, $P =$

0.022). Los grupos experimentales de los machos no resultaron estadísticamente diferentes ($H = 3.615$, gl 2, $p = 0.164$). De manera similar, no hay diferencia estadísticamente significativa entre hembras y machos en el grupo control ($T=75$, $p = 0.505$) y el grupo de vínculo ($T=69$, $p = 0.959$). Se encontró diferencia estadísticamente significativa en la condición experimental de exposición entre hembras y machos ($T=46$, $p = 0.021$) en el gráfico 12.

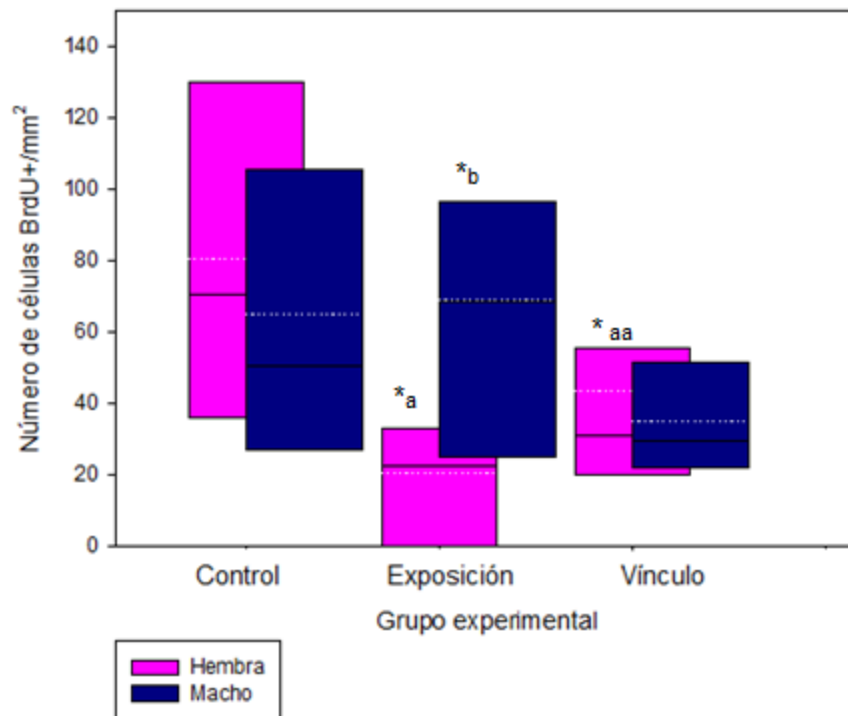


Gráfico 12. Número de células BrdU+ /mm² en la capa glomerular del BOA en los topillos hembra y macho. Se muestran las medianas y los percentiles correspondientes 5 y 95 y para cada grupo. Se realizó un ANOVA en rangos para el análisis estadístico. En las hembras, el grupo control es diferente estadísticamente en comparación con el grupo de exposición (*a) y el grupo de vínculo (*aa) ($p = 0.022$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los topillos macho ($P = 0.164$). En la comparación entre ambos sexos se encontró diferencia estadísticamente significativa en el grupo de exposición (*b) ($p = 0.021$).

En la AMG, el APM y el HVM también se efectuó la comparación del número de células nuevas en los topillos hembra y macho. En el gráfico 13, se muestran los conteos celulares en la AMG. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos de las hembras ($H = 0.323$, gl 2, $p = 0.851$) ni entre los grupos de machos ($H = 1.487$, gl 2, $p = 0.475$). La comparación entre hembra y macho bajo la misma condición experimental no presentó diferencia estadísticamente significativa: control ($T = 79$, $p = 0.279$), exposición ($T = 66$, $p = 0.878$) y vínculo ($T = 74.5$, $p = 0.505$).

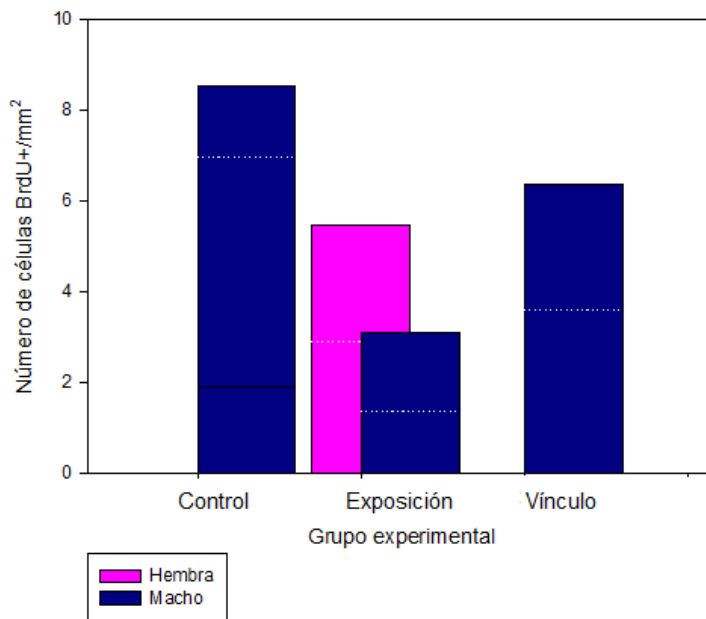


Gráfico 13. Número de células BrdU+ /mm² en la AMG en los topillos hembra y macho. Se muestran las medianas y los percentiles correspondientes 5 y 95 y para cada grupo. Se realizó un ANOVA en rangos para el análisis estadístico. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los topillos hembra ($p = 0.851$), ni entre los topillos macho ($p = 0.475$). La comparación entre ambos sexos bajo el mismo grupo experimental tampoco resultó estadísticamente diferente ($p > 0.05$).

En el APM, solamente dos animales presentaron células BrdU+ pertenecientes a los grupos control macho y vínculo macho; ningún grupo de las hembras presentó nuevas células en esta región. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos de los machos ($H =$

1.049, gl 2, $p= 0.592$). La comparación entre hembra y macho bajo la misma condición experimental no presentó diferencia estadísticamente significativa: control ($T= 64$, $p = 0.721$), exposición ($T=68$, $p = 1$) y vínculo ($T=64$, $p = 0.721$). No se muestra este gráfico.

En el HVM no se encontraron células BrdU⁺ reveladas con fluorescencia, en ninguno de los grupos experimentales en topillos hembra y macho.

7.6 Células BrdU⁺/NeuN⁺ reveladas con fluorescencia y porcentaje de diferenciación neuronal

La determinación del número de células nuevas que adquirieron un fenotipo de neuronas maduras, se realizó a través de la detección de ambos antígenos BrdU y NeuN en los cortes ortogonales, en todas las áreas mencionadas con anterioridad. La prueba estadística realizada fue un análisis de varianza en rangos de una vía Kruskal Wallis (KW) para la evaluación de las tres condiciones experimentales en el mismo sexo y la U de Mann Whitney para la comparación entre ambos sexos bajo la misma condición experimental. En la figura 6, se muestra el número de células BrdU y NeuN positivas y el porcentaje de diferenciación neuronal en la capa granular del BOP. No se encontraron diferencias significativas entre los machos para el número de neuronas nuevas ($H = 1.185$, gl 2, $p = 0.553$) ni en el porcentaje de diferenciación neuronal ($H = 2.435$, gl 2, $p = 0.296$). En las hembras, no hubo diferencia estadísticamente significativa en el número de neuronas nuevas ($H= 3.645$, gl 2, $p = 0.162$). Sin embargo, en el porcentaje de diferenciación neuronal, se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y la exposición ($T=88$, $p= 0.038$) y entre el grupo exposición y vínculo ($T= 89$, $p= 0.028$), ambas diferencias evaluadas con la prueba estadística U de Mann Whitney. La comparación entre ambos sexos, bajo la misma condición experimental, en esta región respecto al número de neuronas nuevas no resultó significativa: control ($T=80$, $p = 0.234$), exposición ($T=57$, $p= 0.279$) y vínculo ($T=70$, $p= 0.278$). El porcentaje de diferenciación neuronal tampoco resultó significativo; control ($T = 53$, $p= 0.130$), exposición ($T= 86$, $p= 0.065$) y vínculo ($T= 60$, $p= 0.442$).

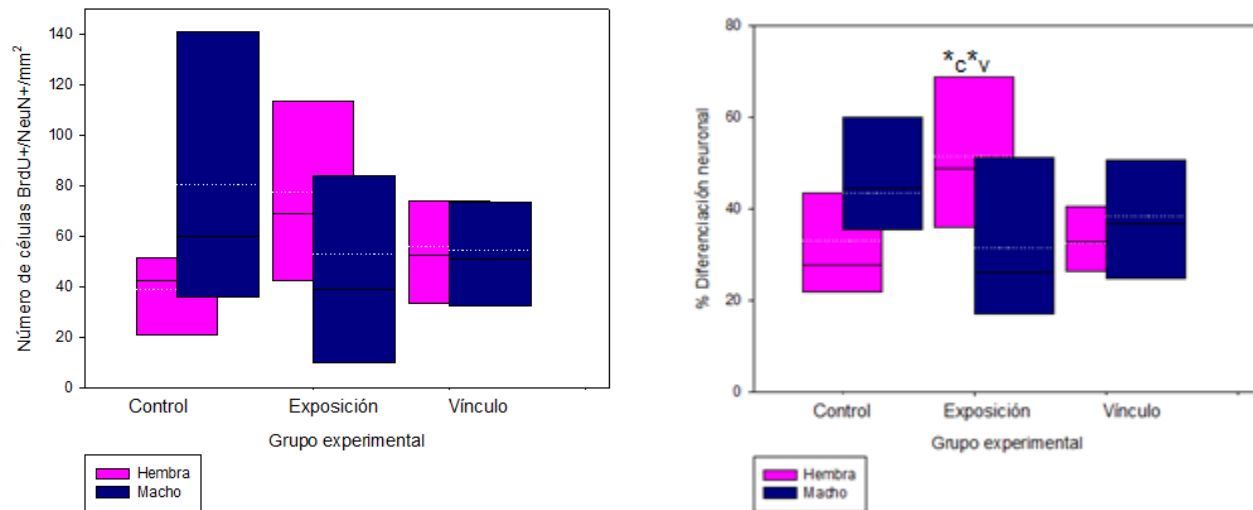


Figura 6. a) Número de células BrdU+/NeuN+ /mm² en la capa granular del BOP en los topillos hembra y macho. Se muestran las medianas y los percentiles correspondientes 5 y 95 y para cada grupo. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los topillos hembra ($p = 0.162$) ni entre los topillos macho ($p = 0.553$). La comparación entre ambos sexos bajo la misma condición experimental tampoco resultó estadísticamente diferente ($p > 0.05$). **B) Porcentaje de diferenciación neuronal.** Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los topillos hembra entre el grupo control y exposición (*c) $p = 0.042$ y el grupo exposición y vínculo (*v) $p = 0.028$. En los topillos macho, no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.296$). La comparación entre ambos sexos bajo la misma condición experimental tampoco resultó estadísticamente diferente ($p > 0.05$).

El número de nuevas neuronas y el porcentaje de diferenciación neuronal en la capa glomerular del BOP, se muestra en la figura 7 en los distintos grupos experimentales. En los topillos hembra no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($H = 0.215$, gl 2, $p = 0.898$), ($H = 0.291$, gl 2, $p = 0.865$); respectivamente. En los topillos macho tampoco se presentan diferencias estadísticamente significativas para ambos parámetros ($H = 3.673$, gl 2, $p = 0.159$), ($H = 4.873$, gl 2, $p = 0.087$). No hubo diferencias estadísticamente significativas en la comparación efectuada entre ambos sexos, bajo la misma condición experimental, en el número de neuronas nuevas;: control ($T = 82$, $p = 0.161$), exposición ($T = 66$, $p = 0.878$)

y vínculo (T= 65, p= 0.798) así como en el porcentaje de diferenciación neuronal: control (T=81, p= 0.195), exposición (T=66.5, p= 0.878) y vínculo (T=61, p= 0.505).

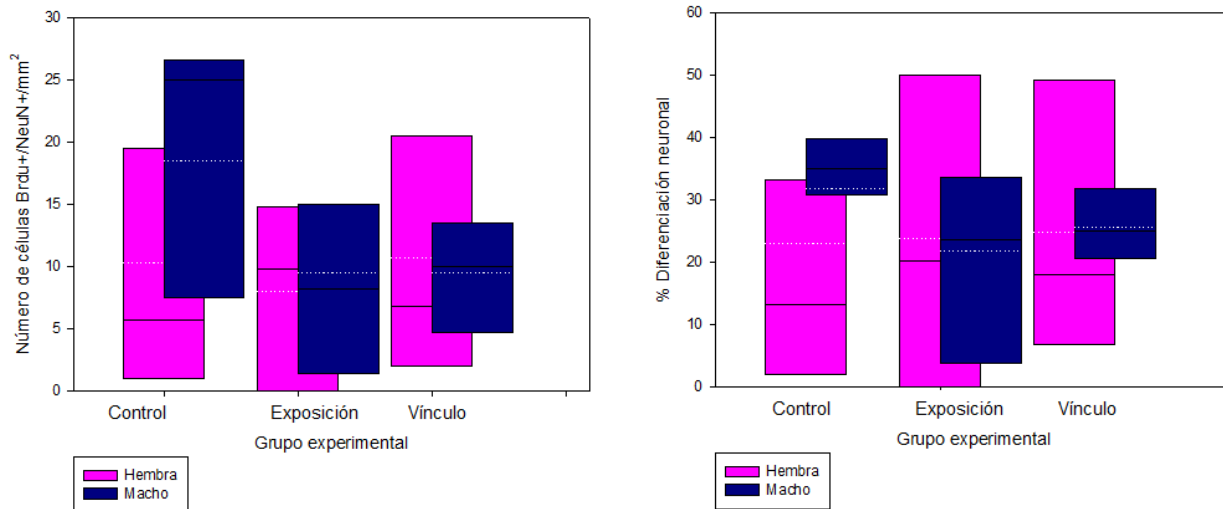


Figura 7 a) Número de células BrdU+/NeuN+ /mm² en la capa glomerular del BOP en los topillos hembra y macho. Se muestran las medianas y los percentiles correspondientes 5 y 95 y para cada grupo. Se realizó un ANOVA en rangos para el análisis estadístico. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los topillos hembra (p= 0.898) ni entre los topillos macho (p = 0.159). La comparación entre ambos sexos, bajo la misma condición experimental, tampoco resulto estadísticamente diferente (p>0.05). **b) Porcentaje de diferenciación neuronal.** Se realizó un ANOVA en rangos para el análisis estadístico. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los topillos hembra (p= 0.865) ni entre los topillos macho (p = 0.087). La comparación entre ambos sexos en el mismo grupo experimental tampoco resulto estadísticamente diferente (p>0.05).

La capa granular del BOA fue dividida en dos secciones: anterior y posterior. En la figura 8, se representa el número de células BrdU+/NeuN+ por mm² y el porcentaje de diferenciación neuronal en la sección anterior. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los topillos hembra para ambos parámetros (H= 0.763, gl 2, p= 0.963), (H= 5.050, gl 2, p= 0.080); respectivamente. En los topillos

macho, tampoco se presentaron diferencias estadísticamente significativas en el número de neuronas nuevas ($H = 1.898$, $gl\ 2$, $p = 0.387$) ni en el porcentaje de diferenciación neuronal ($H = 2.950$, $gl\ 2$, $p = 0.229$). De igual forma, la comparación entre hembras y machos bajo la misma condición experimental, no resultó estadísticamente significativa en el número de neuronas nuevas: control ($T=78.5$, $p= 0.279$), exposición ($T=69$, $p= 0.959$) y vínculo ($T=66.5$, $p= 0.878$), ni en el porcentaje de diferenciación neuronal: control ($T=61.5$, $p= 0.505$), exposición ($T= 73$, $p= 0.645$) y vínculo ($T= 72$, $p=0.721$).

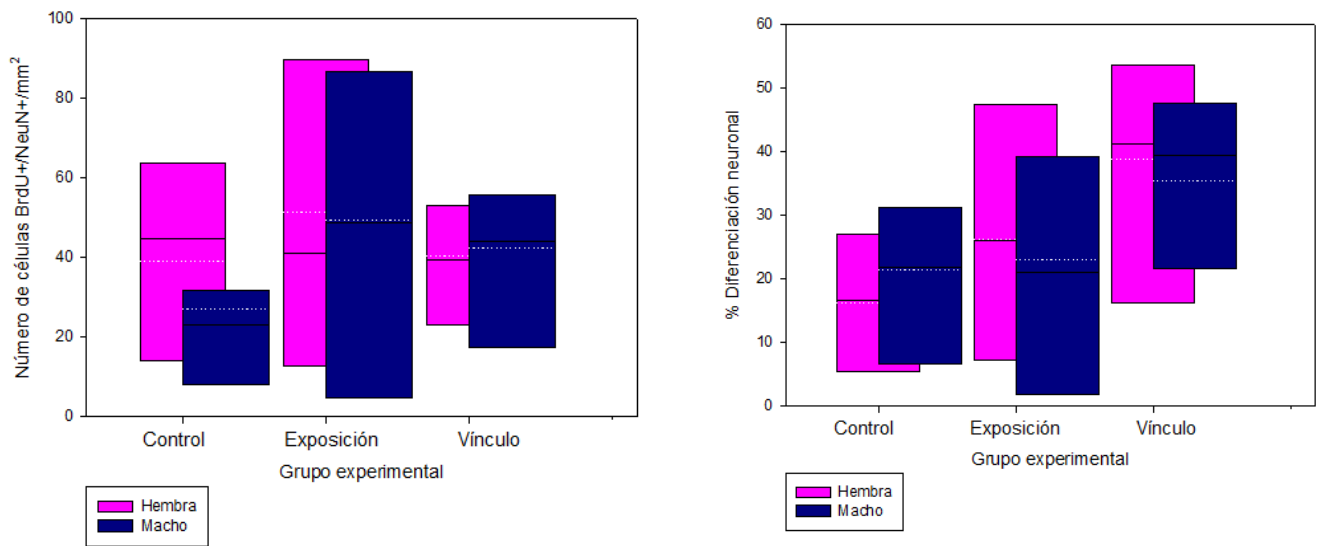


Figura 8 a) Número de células BrdU+/NeuN+ /mm² en la sección anterior de la capa granular del BOA en los topillos hembra y macho. Se muestran las medianas y los percentiles correspondientes 5 y 95 y para cada grupo. Se realizó un ANOVA en rangos para el análisis estadístico. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los topillos hembra ($p= 0.963$) ni entre los topillos macho ($p= 0.387$). La comparación entre ambos sexos, bajo la misma condición experimental, tampoco resultó estadísticamente diferente ($p>0.05$). **b) Porcentaje de diferenciación neuronal.** Se realizó un ANOVA en rangos para el análisis estadístico. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los topillos hembra ($p= 0.080$) ni entre los topillos macho ($p = 0.229$). La comparación entre ambos sexos, bajo la misma condición experimental, tampoco resultó estadísticamente diferente ($p>0.05$).

En la figura 9, se muestra: el número de células BrdU+/mm² y el porcentaje de diferenciación neuronal

en la sección posterior de la capa granular del BOA. No se encontraron diferencias significativas entre las hembras para el número de neuronas nuevas ($H = 0.713$, gl 2, $p = 0.700$) ni en el porcentaje de diferenciación neuronal ($H = 1.509$, gl 2, $p = 0.470$). En los machos, no hubo diferencia estadísticamente significativa en el número de neuronas nuevas ($H = 0.555$, gl 2, $p = 0.758$) ni en el porcentaje de diferenciación neuronal ($H = 2.693$, gl 2, $p = 0.260$). La comparación entre los topillos hembra y macho, bajo la misma condición experimental, no presentó diferencia estadísticamente significativa en el número de neuronas nuevas: control ($T = 60$, $p = 0.442$), exposición ($T = 71$, $p = 0.798$) y vínculo ($T = 69$, $p = 0.959$). El porcentaje de diferenciación neuronal, presentó diferencia estadísticamente significativa en el grupo control entre hembras y machos ($T = 49$, $p = 0.05$). Los otros grupos experimentales no presentan diferencia alguna entre hembras y machos; exposición ($T = 69$, $p = 0.959$) y vínculo ($T = 73$, $p = 0.645$).

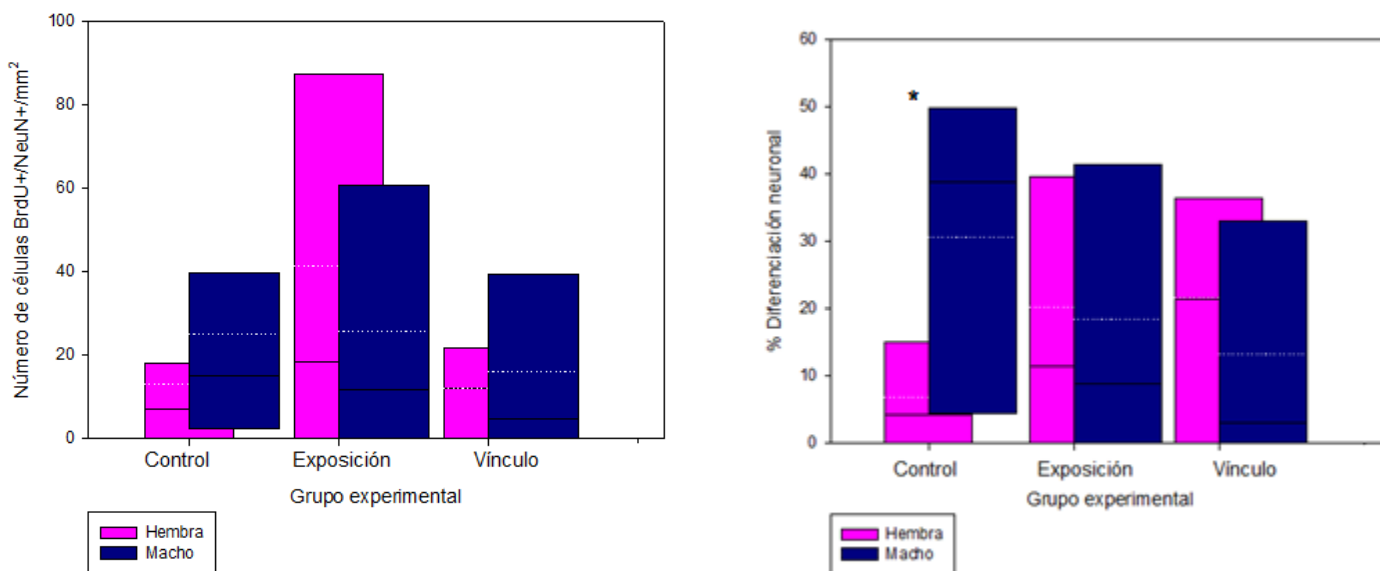


Figura 9 a) Número de células BrdU+/NeuN+ /mm² en la sección posterior de la capa granular del BOA en los topillos hembra y macho. Se muestran las medianas y los percentiles correspondientes 5 y 95 y para cada grupo. Se realizó un ANOVA en rangos para el análisis estadístico. No se encontraron

diferencias estadísticamente significativas entre los topillos hembra ($p= 0.700$) ni entre los topillos macho ($p= 0.758$). La comparación entre ambos sexos, bajo la misma condición experimental, tampoco resultó estadísticamente diferente ($p>0.05$). **b) Porcentaje de diferenciación neuronal.** Se realizó un ANOVA en rangos para el análisis estadístico. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los topillos hembra ($p= 0.470$) ni entre los topillos macho ($p = 0.260$). La comparación entre ambos sexos resultó estadísticamente diferente en el grupo control (*) ($p<0.05$).

El número de nuevas neuronas y el porcentaje de diferenciación neuronal también fue evaluado en la capa glomerular del BOA, en topillos hembra y macho y se muestra en la figura 10. Dentro de los grupos experimentales en los topillos hembra no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($H= 1.233$, $p = 0.540$), ($H= 1.001$, $p= 0.606$); respectivamente. En los topillos macho, se encontró diferencia estadísticamente significativa en el número de neuronas nuevas entre el grupo exposición y vínculo a través de la prueba post hoc Tukey ($H= 9.008$, $p= 0.011$). No obstante, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de diferenciación neuronal ($H= 2.309$, $gl\ 2$, $p= 0.315$). En la comparación efectuada entre ambos sexos, bajo la misma condición experimental, en el número de neuronas nuevas no se presentaron diferencias entre el grupo control ($T=65.5$, $p = 0.798$) ni el grupo de vínculo ($T= 66.5$, $p= 0.878$). No obstante, la comparación entre hembras y machos bajo la condición de exposición, resultó estadísticamente diferente ($T=43$, $p = 0.007$). Respecto al porcentaje de diferenciación neuronal no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos sexos, bajo la misma condición experimental: control ($T=58.5$, $p= 0.328$), exposición ($T=51$, $p= 0.083$) y vínculo ($T=66.5$, $p= 0.878$).

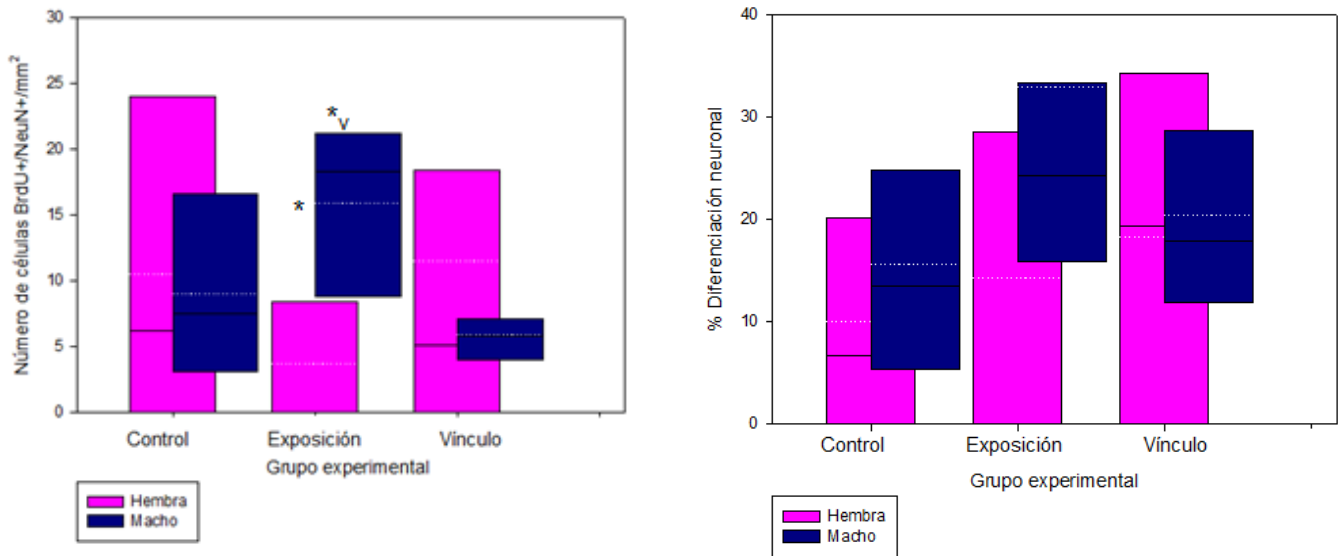


Figura 10. a) Número de células BrdU+ /mm² en la capa glomerular del BOA en los topillos hembra y macho. Se muestran las medianas y los percentiles correspondientes 5 y 95 y para cada grupo. Se realizó un ANOVA en rangos para el análisis estadístico. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los topillos hembra ($p = 0.540$). En los topillos macho el grupo de exposición y vínculo fue estadísticamente diferente ($p = 0.011$). La comparación entre ambos sexos bajo la condición de exposición resultó estadísticamente diferente ($p > 0.05$). **b) Porcentaje de diferenciación neuronal.** Se realizó un ANOVA en rangos para el análisis estadístico. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los topillos hembra ($p = 0.606$) ni entre los topillos macho ($p = 0.315$). La comparación entre ambos sexos, bajo la misma condición experimental, tampoco resultó estadísticamente diferente ($p > 0.05$).

En la AMG, también se efectuó la comparación del número de neuronas nuevas y el porcentaje de diferenciación neuronal, en los topillos hembra y macho. En la figura 11, se muestra el número de células BrdU+NeuN+/mm² y el porcentaje de diferenciación neuronal en esta región. No se encontraron diferencias significativas entre las hembras para el número de neuronas nuevas ($H = 0.0151$, gl 2, $p = 0.992$) ni en el porcentaje de diferenciación neuronal ($H = 0.0151$, gl 2, $p = 0.992$). En los machos, no hubo diferencia estadísticamente significativa en el número de neuronas nuevas ($H = 1.0$, gl 2, $p = 0.607$)

ni en el porcentaje de diferenciación neuronal ($H= 1.142$, $gl\ 2$, $p= 0.565$). La comparación entre los topillos hembra y macho, bajo la misma condición experimental, no presentó diferencia estadísticamente significativa en el número de neuronas nuevas: control ($T=76.5$, $p= 0.382$), exposición ($T=68.5$, $p= 0.959$) y vínculo ($T=74.5$, $p= 0.505$). El porcentaje de diferenciación neuronal tampoco presentó diferencia estadísticamente significativa entre ambos sexos dentro de los grupos experimentales: control ($T=59.5$, $p= 0.382$), exposición ($T=67.5$, $p= 0.959$) y vínculo ($T=60.5$, $p= 0.442$).

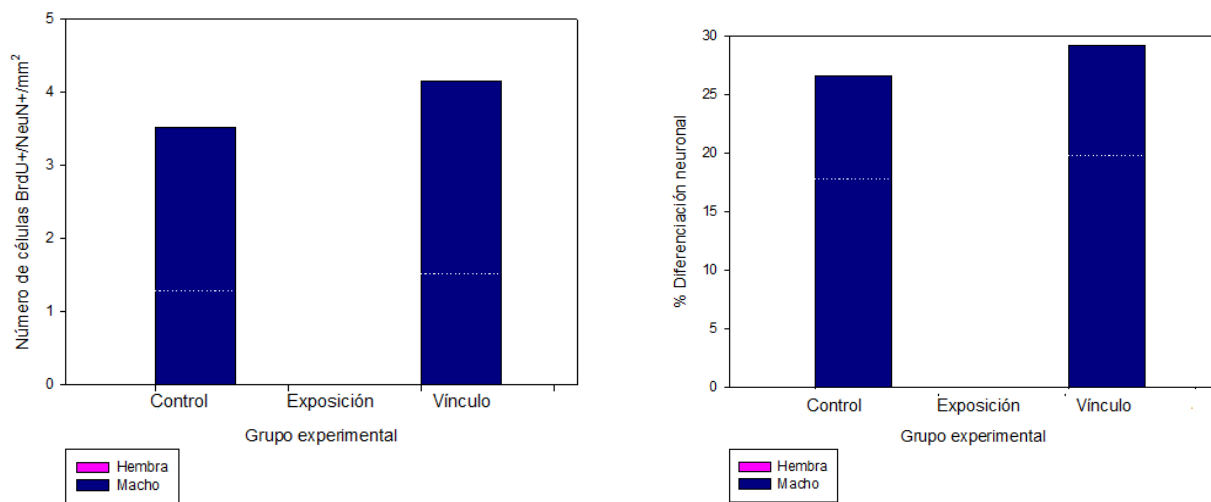


Figura 11. a) Número de células BrdU+/NeuN+ /mm² en la AMG en los topillos hembra y macho.

Se muestran las medianas y los percentiles correspondientes 5 y 95 y para cada grupo. Se realizó un ANOVA en rangos para el análisis estadístico. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los topillos hembra ($p= 0.992$) ni entre los topillos macho ($p= 0.607$). La comparación entre ambos sexos, bajo la misma condición experimental, tampoco resultó estadísticamente diferente ($p>0.05$). **b) Porcentaje de diferenciación neuronal.** Se realizó un ANOVA en rangos para el análisis estadístico. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los topillos hembra ($p= 0.992$) ni entre los topillos macho ($p= 0.565$). La comparación entre ambos sexos, bajo la misma condición experimental, tampoco resultó estadísticamente diferente ($p>0.05$).

En el APM y el HVM, no se encontró la expresión del marcador BrdU, por lo que no hubo proliferación ni diferenciación celular en estas regiones.

8. Discusión de resultados y conclusiones

En la primera parte de este estudio se realizó la determinación de los parámetros de la conducta sexual en el topillo de la pradera. Diversos estudios, han descrito en detalle este comportamiento en roedores que no siguen un modelo social y de apareamiento monógamo, como es el caso de ratas y ratones, entre otros.

De acuerdo a la tabla 2, los topillos macho presentan patrones de cópula básicos, presentes en otras especies de roedores; tales como: múltiples movimientos pélvicos e intromisiones y al menos dos eyaculaciones antes de alcanzar el criterio de saciedad (Gray y Dewsbury, 1973).

Los topillos hembra, no presentan el estro de manera espontánea y requieren de un estímulo proveniente de un macho no familiar o la administración de estradiol (estrategia empleada en este estudio), y como se reporta en la tabla 3, la media del LQ fue del 65%, indicando que las hembras utilizadas durante la prueba se encontraban sexualmente receptivas.

La formación del vínculo de pareja se encuentra mediada por la cópula y la cohabitación de los miembros correspondientes de la pareja afiliativa. En este estudio, no se demostró la formación del vínculo de pareja, sin embargo, los animales pertenecientes a este grupo experimental se les permitió copular ad libitum por un período de 6 horas; en el cual se llevó a cabo el registro y permanecieron cohabitando por 15 días más hasta el día de la eutanasia. Estas condiciones de laboratorio son las requeridas para inducir la formación de vínculo de pareja de acuerdo con la literatura (Carter et al; 1995)

En este trabajo se evaluó la neurogénesis, proceso que puede ser incrementado o reducido por varios factores y se analizó el efecto del vínculo de pareja y la exposición a olores sobre el mismo.

Con el método de revelado con DAB para la detección del antígeno BrdU, se encontró que las hembras que copularon por 6 horas y se vincularon con su pareja macho, presentan baja densidad de células BrdU+ en la sección anterior de la capa granular del BOA en comparación con las hembras del grupo

control. No se encontraron otras diferencias estadísticamente significativas en las otras regiones señaladas para este estudio en los topillos hembra y macho, bajo este proceso de revelado.

El BOA en ratones hembra es una región involucrada en el reconocimiento de feromonas provenientes de los machos, por lo que el decremento celular y una tendencia mayor de diferenciación neuronal, posterior a la formación del vínculo de pareja en los topillos hembra, podría optimizar el aprendizaje olfatorio y la discriminación de odorantes, requeridas para la identificación de la pareja afiliativa (Newman y Halpin, 1988; Mouret et al; 2008).

Con el fin de incrementar la sensibilidad del método de detección del antígeno, se utilizó el sistema de amplificación de señal mediado por tiramida (TSA). Se presentaron diferencias en el conteo automático bajo el revelado con DAB y conteo manual realizado con el TSA, esto debido a que aunque ambos revelados se encuentran mediados por procesos enzimáticos, el segundo mejora la resolución a través del incremento de la sensibilidad.

Utilizando el método de TSA , encontramos, que el número de células nuevas fue mayor en las hembras del grupo control respecto a la condiciones experimentales de exposición y vínculo en la capa glomerular del BOA, sin embargo, se observa una tendencia (no significativa) que el porcentaje de diferenciación neuronal fue mayor en el grupo de vínculo en esta misma región; sugiriendo que la presencia de odorantes y feromonas de otro sujeto estimula la diferenciación neuronal, ya que el BOA recibe entradas de información sináptica a través de la capa glomerular, mediado por las neuronas vomeronasales sensoriales que expresan el mismo gen receptor y activan múltiples glomérulos en el BOA (Hammen et al;2014)

En esta misma región, encontramos, que existe mayor número de células nuevas y neuronas en los topillos macho, bajo la condición de exposición, respecto a las hembras en esta misma condición experimental. Esta diferencia en los machos respecto a las hembras, sugiere que como en estudios previos realizados en ratones, la respuesta a la orina de las hembras en comparación con la orina de los machos es más fuerte;

medida como la suma del volumen de glomérulos activados a partir de la exposición a los respectivos odorantes provenientes de las hembras en la parte anterior del BOA, sugiriendo que la respuesta en los glomérulos a las sustancias volátiles y no volátiles presentes en la orina de la hembra posee un largo territorio sináptico en el BOA (Hammen et al; 2014).

Dentro de los grupos de machos, el número de neuronas es mayor en el grupo de exposición respecto al que formó el vínculo de pareja en esta misma capa del BOA. En un estudio realizado en ratones macho, se demostró, que la exposición repetida a un ambiente olfatorio estable (la presencia de la misma mezcla de odorantes) en comparación con la exposición repetida a un ambiente olfatorio novedoso, no incrementaba la neurogénesis en el BO ni en la SVZ (Veyrac, 2009); sugiriendo que el grupo de vínculo de pareja, el cual permaneció junto a su pareja por 15 días y estuvo expuesto al mismo estímulo olfatorio, no resulta novedoso este estímulo y no promueve el incremento de la neurogénesis.

Respecto al porcentaje de diferenciación neuronal, se observa un incremento en la capa granular del BOP en los topillos hembra, pertenecientes al grupo de exposición en comparación con el grupo control y vínculo. En roedores adulto, la generación e integración de nuevas neuronas a circuitos existentes del BOP, principalmente en la capa granular (alrededor del 95%) (Unda et al; 2016), juega un papel crucial en la discriminación de olores y no altera la memoria olfatoria a corto plazo (Gheusi et al; 2000).

Finalmente, en la sección posterior de la capa granular del BOA, se observó un aumento en el porcentaje de diferenciación neuronal en los topillos macho del grupo control en comparación con los topillos hembra, bajo la misma condición experimental. Este dimorfismo sexual ya fue demostrado en ratas, los neuroblastos de la capa subependimal que migran al BOA o aquellos que sobreviven dentro de la capa granular del BOA son más numerosos en machos que en hembras; aunque esta migración se realiza predominantemente hacia la parte anterior del BOA, y ha sido asociado a la discriminación de feromonas sexuales (Peretto, 2001).

En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio, muestran que la formación de vínculo de pareja no está mediado por el incremento de la proliferación celular y subsecuentemente el aumento de la diferenciación neuronal. Sin embargo, en los topillos de la pradera como en otros roedores, la exposición a un estímulo olfativo novedoso presenta un rol importante en la inducción de neurogénesis, sugiriendo que este proceso plástico interviene en el reconocimiento de olores y posiblemente la identificación de la pareja afiliativa, más no en el proceso de formación de vínculo.

Literatura citada.

- Ågmo A, 1997. Male rat sexual behavior. *Brain Res Protoc*; 1(2):203–9.
- Altman J y Das GD, 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*; 124(3):319–35.
- Alvarez-Buylla A y García-Verdugo JM, 2002. Neurogenesis in Adult Subventricular Zone. *J Neurosci*; 22(3):629–34.
- Aragona Brandon J. y Wang Zuoxin, 2004. The Prairie Vole (*Microtus ochrogaster*): An Animal Model for Behavioral Neuroendocrine Research on Pair Bonding. *ILAR J*; 45(1):35-45.
- Arzate DM, Portillo W, Corona R, Paredes RG, 2013. Repeated paced mating promotes the arrival of more newborn neurons in the main and accessory olfactory bulbs of adult female rats. *Neuroscience* 1;232:151–60.
- Balu DT y Lucki I, 2009. Adult Hippocampal Neurogenesis: Regulation, Functional Implications, And Contribution to Disease Pathology. *Neurosci Biobehav Rev*.33 (3):232–52.
- Beach FA, 1976. Sexual attractivity, proceptivity, and receptivity in female mammals. *Horm Behav*; 7(1):105–38.
- Bester-Meredith JK, Fancher AP, Mammarella GE, 2015. Vasopressin proves essential: vasopressin and the modulation of sensory processing in mammals. *Neuroendocr Sci*; 6:5.

- Bowlby John, 2007. Maternal Deprivation Theory. Simply Psychology [Internet]. Available from: <http://www.simplypsychology.org/bowlby.html>
- Burrone MS, Gallo V, Lucchese M, Villace B, Enders JE, Fernández R, 2012. Analysis of family environments related to primary schoolchildren mental health in a community located in the Province of Córdoba, Argentina. *Cad Saúde Coletiva*; 20(4):453–9.
- Carter CS, DeVries AC, Getz LL, 1995. Physiological substrates of mammalian monogamy: the prairie vole model. *Neurosci Biobehav Rev* 19: 303-314. *Neurosci Biobehav Rev*;19(2):303–14.
- Carter CS, Witt DM, Schneider J, Harris ZL, Volkening D, 1987. Male stimuli are necessary for female sexual behavior and uterine growth in prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Horm Behav*;21(1):74–82.
- Carter, C. S., Witt, D. M., & Getz, LL, 2016. Behavioral and physiological adaptations suggesting monogamy in the prairie vole (*Microtus ochrogaster*) [Internet]. RTI.
- Cho MM, Courtney A, Williams JR, Sue C, 1999. The effects of oxytocin and vasopressin on partner preferences in male and female prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Behav Neurosci*;113(5):1071–9.
- Corona R, Larriva-Sahd J, 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* [Internet]; 6(5).
- Corona R, Retana-Márquez S, Portillo W, Paredes RG, 2016. Sexual Behavior Increases Cell Proliferation in the Rostral Migratory Stream and Promotes the Differentiation of the New Cells into Neurons in the Accessory Olfactory Bulb of Female Rats. *Front Neurosci* [Internet].
- DeVries AC, DeVries MB, Taymans S, Carter CS, 1995. Modulation of pair bonding in female prairie voles (*Microtus ochrogaster*) by corticosterone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15;92(17):7744–8.

- DeVries AC, Glasper ER, Detillion CE, 2003. Social modulation of stress responses. *Physiol Behav*;79(3):399–407.
- Dudley CA y Moss RL, 1999. Activation of an anatomically distinct subpopulation of accessory olfactory bulb neurons by chemosensory stimulation. *Neuroscience*;91(4):1549–56.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn A-M, Nordborg C, Peterson DA, et al, 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*;4(11):1313–7.
- Fisher HE, Xu X, Aron A, Brown LL, 2016. Intense, Passionate, Romantic Love: A Natural Addiction? How the Fields That Investigate Romance and Substance Abuse Can Inform Each Other. *Front Psychol*; 7:687.
- Gavish L, Hofmann JE, Getz LL, 1984. Sibling recognition in the prairie vole, *Microtus ochrogaster*. *Anim Behav*;32(2):362–6.
- Getz LL y Hofmann JE, 1986. Social Organization in Free-Living Prairie Voles, *Microtus ochrogaster*. *Behav Ecol Sociobiol*;18(4):275–82.
- Getz LL, Carter CS, Gavish L, 1981. The mating system of the prairie vole, *Microtus ochrogaster*: Field and laboratory evidence for pair-bonding. *Behav Ecol Sociobiol*; 8(3):189–94.
- Gheusi G, Cremer H, McLean H, Chazal G, Vincent J-D, Lledo P-M, 2000. Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. *Proc Natl Acad Sci U S A*;97(4):1823–8.
- Goldman SA y Nottebohm F, 1983. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*;80(8):2390–4.
- Gray G y Dewsbury D.A, 1973. A Quantitative Description of Copulatory Behavior in Prairie Voles (*Microtus ochrogaster*) [Internet]. ResearchGate].
- Gross CG, 2000. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat Rev Neurosci*. 1(1):67–73.

- Halem HA, Cherry JA, Baum MJ, 1999. Vomeronasal neuroepithelium and forebrain Fos responses to male pheromones in male and female mice. *J Neurobiol*;39(2):249–63.
- Hammen GF, Turaga D, Holy TE, Meeks JP, 2014. Functional organization of glomerular maps in the mouse accessory olfactory bulb. *Nat Neurosci*;17(7):953–61.
- Hau J, Schapiro SJ, Jr GLVH, 2004. *Handbook of Laboratory Animal Science, Second Edition: Animal Models*. CRC, 319 p.
- Hazan C y Shaver P, 1987. Romantic love conceptualized as an attachment process. *J Pers Soc Psychol*;52(3):511–24.
- Hazan C y Shaver P, 1994. Attachment as an Organizational Framework for Research on Close Relationships. *Psychological Inquiry*; 5(1):22.
- House JS, Landis KR, Umberson D, 1988. Social relationships and health. *Science*; 241(4865):540–5.
- Insel Thomas R, 1997 A neurobiological basis of social attachment. *Am J Psychiatry*; 154(6):726–35.
- Insel TR, Winslow JT, Wang Z, Young LJ, 1988. Vasopressin and Oxytocin: Molecular, Cellular, and Clinical Advances. In: Zingg HH, Bourque CW, Bichet DG, editors. Boston, MA: Springer US; p. 215–224.
- Kawachi I y Berkman LF, 2001. Social ties and mental health. *J Urban Health*;78(3):458–67.
- Kirkpatrick B, Williams JR, Slotnick BM, Carter CS,1994. Olfactory bulbectomy decreases social behavior in male prairie voles (*M. ochrogaster*). *Physiol Behav*;55(5):885–9.
- Leuner B, Glasper ER, Gould E, 2010. Sexual experience promotes adult neurogenesis in the hippocampus despite an initial elevation in stress hormones. *PloS One.*;5(7):e11597.
- Lim MM y Young LJ, 2004. Vasopressin-dependent neural circuits underlying pair bond formation in the monogamous prairie vole. *Neuroscience*; 125(1):35–45.

- Lincoln KD, 2000. Social Support, Negative Social Interactions, and Psychological Well-Being. *Soc Serv Rev*;74(2):231–52.
- Ming G-L y Song H, 2011. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*; 70(4):687–702.
- Mombaerts P, 2004. Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. *Nat Rev Neurosci*; 5(4):263–78.
- Neil Carlson R, 1996. *Fundamentos de Psicología Fisiológica*. 3rd ed. Massachusets.
- Newman KS y Halpin ZT, 1988. Individual odours and mate recognition in the prairie vole, *Microtus ochrogaster*. *Anim Behav*; 36(6):1779–87.
- Paz y miñatno G y Tang-Martínez, 1999. Effects of isolation on sibling recognition in prairie voles, *Microtus ochrogaster*. *Anim Behav*;57(5):1091–8.
- Peretto P, Giachino C, Panzica GC, Fasolo A, 2001. Sexually dimorphic neurogenesis is topographically matched with the anterior accessory olfactory bulb of the adult rat. *Cell Tissue Res*;306(3):385–9
- Peretto P y Paredes RG, 2014. Social Cues, Adult Neurogenesis, and Reproductive Behavior. In: Mucignat-Caretta C, editor. *Neurobiology of Chemical Communication* [Internet]. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2014 (Frontiers in Neuroscience).
- Pfaus JG, Smith WJ, Coopersmith CB, 1999. Appetitive and Consummatory Sexual Behaviors of Female Rats in Bilevel Chambers: I. A Correlational and Factor Analysis and the Effects of Ovarian Hormones. *Horm Behav*;35(3):224–40.
- Pfisterer U y Khodosevich K, 2017. Neuronal survival in the brain: neuron type-specific mechanisms. *Cell Death Dis*;8(3):e2643.
- Pignatelli A y Belluzzi O, 2010. Neurogenesis in the Adult Olfactory Bulb. *The Neurobiology of Olfaction* [Internet]. (Frontiers in Neuroscience).

- Portillo W, Unda N, Camacho FJ, Sánchez M, Corona R, Arzate DM, et al, 2012. Sexual activity increases the number of newborn cells in the accessory olfactory bulb of male rats. *Front Neuroanat*;6:25.
- Rook KS, 1984. The negative side of social interaction: Impact on psychological well-being. *J Pers Soc Psychol*;46(5):1097–108.
- Ross E, Mirowsky J, Goldsteen K, Ross CE, Mirowsky J, Goldsteen K, 1990. The impact of the family on health: The decade in review. *J Marriage Fam*;1059–1078.
- Salcedo JFS, 2008. Los vínculos sociales como formas de regulación. Reflexiones sobre el poder de los vínculos en la sociedad colombiana [Internet]. *Nóesis. Revista de Ciencias Sociales y Humanidades*.
- Smale L, Nelson RJ, Zucker I, 1985. Neuroendocrine responsiveness to oestradiol and male urine in neonatally androgenized prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *J Reprod Fertil*;74(2):491–6.
- Smith MT, Pencea V, Wang Z, Luskin MB, Insel TR, 2001. Increased Number of BrdU-Labeled Neurons in the Rostral Migratory Stream of the Estrous Prairie Vole. *Horm Behav.*;39(1):11–21.
- Sokolowski K y Corbin JG, 2012. Wired for behaviors: from development to function of innate limbic system circuitry. *Front Mol Neurosci*;5:55.
- Sui Y, 2012. Neurogenesis in the adult rodent SVZ and OB. *PLoS One*; 7(2): e31549.
- Unda NM, Portillo W, Corona R, Paredes RG, 2016. Sexual Stimulation Increases the Survival of New Cells in the Accessory Olfactory Bulb of the Male Rat. *Front Neurosci*;10:65.
- Veyrac Alexandra, Sacquet Joëlle, Nguyen Véronique, Marien Marc, Jourdan François y Anne Didier, 2009. *Neuropsychopharmacology*; **34**, 786–795.
- Vezzetti CV, 2016. New approaches to divorce with children: A problem of public health. *ResearchGate* [Internet].

- Whitman MC y Greer CA, 2009. Adult Neurogenesis and the Olfactory System. *Prog Neurobiol*;89(2):162–75.
- Williams JR, Slotnick BM, Kirkpatrick BW, Carter CS,1999. Olfactory bulb removal affects partner preference development and estrus induction in female prairie voles. *Physiol Behav*; 52(4):635–9.
- Witt DM, Carter CS, Insel TR, 1991. Oxytocin Receptor Binding in Female Prairie Voles: Endogenous and Exogenous Oestradiol Stimulation. *J Neuroendocrinol*;3(2):155–61. Young KM, Fogarty M, Kessarar N, Richardson WD, 2007. Subventricular Zone Stem Cells Are Heterogeneous with Respect to Their Embryonic Origins and Neurogenic Fates in the Adult Olfactory Bulb. *J Neurosci*;27(31):8286–96.
- Young LJ, Wang Z, 2004. The neurobiology of pair bonding. *Nat Neurosci*.;7(10):1048–54.