



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**  
**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**EFFECTO DE LA PROLACTINA EN EL BULBO OLFATORIO: RESPUESTA CELULAR  
Y EXPRESION DE LIGANDO Y RECEPTOR DURANTE LA MADURACIÓN SEXUAL**

**TESIS**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
**MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**  
**BIOL. VIRIDIANA CERBANTEZ BUENO**

**DRA. REBECA CORONA GARCÍA-CABRAL**  
**DRA. MARIA TERESA MORALES GUZMÁN**  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA, UNAM CAMPUS JURQUILLA

**DRA. MÓNICA ANDREA LÓPEZ HIDALGO**  
ENES JURQUILLA, UNAM CAMPUS JURQUILLA  
**DR. CARLOS GUILLERMO MARTÍNEZ MORENO**  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM CAMPUS JURQUILLA

Querétaro, Qro, enero de 2021



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.

El presente proyecto de maestría se realizó en el Laboratorio de Neuroanatomía Funcional y Neuroendocrinología del Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México Campus Juriquilla, bajo la dirección de la Dra. Rebeca Corona García-Cabral y la Dra. María Teresa Morales Guzmán. Agradezco a ambas, de corazón, la orientación, la paciencia y todo el conocimiento que me compartieron para poder desarrollar esta tesis. **Esta investigación fue apoyada por el programa UNAM-DGAPA-PAPIIT IA202218, IA200820 e IN204718, además del donativo CONACYT A1S8948. La autora contó con beca del CONACYT (738736).**

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dra. Rebeca Corona García-Cabral

Dra. María Teresa Morales Guzmán

Dr. Carlos Guillermo Martínez Moreno

Dra. Andrea López Hidalgo

Gracias por sus comentarios y sugerencias que fueron fundamentales para mi formación durante este periodo.

Agradezco el apoyo técnico brindado por el personal del INB, en especial a la Biól. Maria Eugenia Ramos Aguilar, en su momento técnico académico del Laboratorio donde realicé esta tesis. A la Dra. Alejandra Castilla León, Dra. María A. Carbajo Mata del Laboratorio Universitario de Bioterio; a Ing. Nydia Hernández Rios de la Unidad de Microscopía; a la M.C. Adriana González Gallardo de la Unidad de Proteogenómica; A la Dra. Deisy Gasca Martínez de la Unidad de Análisis Conductual. Además agradezco el apoyo en trámites administrativos y académicos por parte de la Dra. Nuri Aranda López de la Unidad de Enseñanza.

A mis compañeros de laboratorio, que siempre me apoyaron y orientaron cuando tenía dudas. A a Ilektra por además de eso regalarme su amistad. A Preethi por su paciencia y tiempo para apoyarme y guiarme en mis experimentos.

A Gama, Anna y Brenda por ser mis amigos y compañeros durante estos años, espero que el tiempo nos vuelva a reunir y nuestra amistad perdure. También a mis amigos de siempre, de GDL, por haberse mantenido siempre en contacto y estar ahí cuando los necesitaba.

A mis papás, que sin ellos esto no hubiera sido posible. Gracias por los mensajes de aliento y por siempre estar atentos. Ustedes son mi inspiración y ya saben que cada logro siempre va

dedicado a ustedes; y también para mi abuelita Josefina por ser mi segunda madre. Agradezco a mis hermanos por apoyarme siempre y mantener el contacto a pesar de la distancia.

**Abreviaturas utilizadas:**

**ARC:** Núcleo arqueado

**ARNm:** Acido ribonucleico mensajero

**AVPV:** Núcleo anteroventral del hipotálamo

**BAOT:** Núcleo del lecho del tracto olfatorio accesorio

**BNST:** Núcleo del lecho de la estría terminal

**BO:** Bulbo olfatorio

**BOA:** Bulbo olfatorio accesorio

**BOP:** Bulbo olfatorio principal

**CG:** Células granulares/ capa granular

**CM:** Celulas mitrales/ capa mitral

**DA:** Dopamina

**E#:** Día de desarrollo embrionario

**FSH:** Hormona folículo estimulante

**GABA:** Acido gamma-aminobutírico

**GH:** Hormona de crecimiento

**GnRH:** Hormona liberadora de gonadotropinas

**HHG:** Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas

**JAK:** Janus kinase, proteína cinasa Janus

**LH:** Hormona luteinizante

**MeA:** Amígdala medial

**MeAV:** Amígdala medial anteroventral

**MePD:** Amígdala medial posterodorsal

**MPN:** Núcleo preóptico medial

**OVN:** Organo vomeronasal

**P#:** Edad posnatal (días)

**PG:** Células periglomerulares

**PI3K:** Fosfatidil inositol-3 cinasa

**PKC:** Proteína cinasa C

**PMCo:** Núcleo amigdaloido posteromedial cortical

**PRL:** Prolactina

**PRLR:** Receptor de prolactina

**PRLR-L:** Receptor de prolactina (isoforma larga)

**RT-qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa, PCR cuantitativa, por método de retrotranscripción

**SNC:** Sistema nervioso central

**STAT:** Signal transducer and activator of transcription, activador de la transcripción y transductor de señal.

**VIP:** Péptido vasoactivo intestinal

**VMHvl:** núcleo ventromedial del hipotálamo ventrolateral

**ZSV:** Zona subventricular del hipotálamo

# Índice

Resumen.....	1
Abstract .....	1
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>2</b>
<b>ANTECEDENTES GENERALES.....</b>	<b>3</b>
<b>Maduración sexual.....</b>	<b>3</b>
<b>Sistema olfatorio .....</b>	<b>5</b>
<b>Organización celular del BO .....</b>	<b>7</b>
<b>Prolactina y su receptor.....</b>	<b>10</b>
<b>ANTECEDENTES DIRECTOS .....</b>	<b>12</b>
<b>Prolactina, olfato y reproducción.....</b>	<b>13</b>
<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>15</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>15</b>
<b>OBJETIVO PRINCIPAL.....</b>	<b>15</b>
<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>16</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
<b>Diseño experimental. ....</b>	<b>16</b>
<b>Caracterización de la expresión de <i>Prl</i> y <i>Prlr-I</i>.....</b>	<b>16</b>
<i>Análisis de los datos obtenidos por qPCR.....</i>	<i>18</i>
<b>Exposición olfatoria a un estímulo sexualmente relevante y cuantificación de la activación celular por expresión de c-Fos .....</b>	<b>18</b>
<i>Cuantificación de células positivas para c-Fos.....</i>	<i>21</i>
<i>Análisis de exploración del estímulo olfatorio.....</i>	<i>22</i>
<i>Análisis estadístico .....</i>	<i>23</i>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>24</b>
<i>Cuantificación del ARNm de <i>Prl</i> y <i>Prlr-I</i> en el BO. ....</i>	<i>24</i>
<i>Permanencia y exploración del sitio de estímulo .....</i>	<i>27</i>
<i>Conteo de células positivas para c-Fos .....</i>	<i>28</i>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>32</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>39</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>42</b>

## Resumen

La prolactina (PRL) tiene descritas más de 300 funciones, las cuales incluyen su participación en procesos reproductivos. La PRL puede verse alterada por la percepción de olores, los cuales a su vez interfieren en el funcionamiento de la vía vomeronasal y el eje reproductivo. Aunado a esto, existen evidencias de la expresión de receptores de PRL (PRLR) en el bulbo olfatorio (BO) durante el desarrollo. En este proyecto se dio un seguimiento a la expresión del ARNm de PRLR (*Prlr-l*) en el BO de ratones hembra de diferentes edades a lo largo de la maduración sexual. Se realizó una estimulación olfatoria con un estímulo sexualmente relevante a una hembra adulta virgen tras un tratamiento agudo de PRL. Encontramos que si bien el *Prlr-l* y la *Prl* no tienen niveles de expresión específicos para cada etapa; el tratamiento con PRL potencia de manera significativa con la respuesta típica del BO ante un estímulo sexual y favorece la activación de la región anterior del bulbo olfatorio accesorio (BOA), región encargada del procesamiento de estímulos sociales y sexualmente relevantes. La PRL también parece estar promoviendo la exploración olfatoria ante un estímulo sexualmente relevante.

## Abstract

Prolactin (PRL) has more than 300 functions, including its participation in reproductive processes. PRL function can be altered by odors related to vomeronasal pathway and the reproductive axis. Furthermore, data support the expression of PRLR in the olfactory bulb (BO) during development. In this project, the expression of mRNA of PRLR (*Prlr-l*) in BO during different stages of sexual maturation has been followed. We also stimulated adult female mice with sexual relevant odors after a PRL treatment. We found that the expression of *Prl* and *Prlr-l* had no specific levels along reproductive stages, however, PRL treatment interfered with previously described responses. PRL also facilitated differential activation of anterior region of accessory olfactory bulb (BOA), which is the region specialized in processing sexual stimuli and other social odors. PRL seems to be promoting the olfactory exploration of a sexual relevant stimuli.

# INTRODUCCIÓN

La reproducción ha permitido a las especies asegurar su supervivencia a través de su trayectoria evolutiva. A lo largo de su desarrollo individual, los organismos pasan por una serie de adaptaciones que los preparan para llevar a cabo la reproducción (Norris, 2013). En los vertebrados, los procesos fisiológicos relacionados a la reproducción están regulados por la glándula hipofisiaria, y las hormonas que libera la misma, como las gonadotropinas, la hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés) y la hormona folículo estimulante (FSH, por sus siglas en inglés). A su vez, la actividad de la hipófisis está mediada por la actividad de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH, por sus siglas en inglés), que es secretada por un grupo de neuronas en la zona preóptica del hipotálamo a la eminencia media donde interacciona con el tallo hipofisiario y así modula la actividad de la hipófisis (Plant, 2002).

El olfato está estrechamente ligado con la reproducción, ya que permite la identificación de señales sexualmente relevantes; moléculas volátiles y no volátiles que pueden modular diferentes respuestas hormonales relacionadas a la reproducción. En hembras, el sistema olfatorio puede inducir la secreción de GnRH (Yoon, Enquist, & Dulac, 2005) o potenciar la liberación de LH. Este último proceso ocurre vía interrupción de la liberación de prolactina (PRL), que puede a su vez inducir la receptividad de las hembras e incluso el inicio de la pubertad (Li *et al.*, 1990; Lomas & Keverne, 1982; Rosser *et al.*, 1989). Sin embargo, no se sabe mucho sobre el papel de la PRL en la relación olfato-eje reproductivo. Este proyecto pretende contribuir con la generación de conocimiento sobre el papel de la PRL en la respuesta del bulbo olfatorio (BO) en la reproducción, en este caso particular, durante la maduración sexual. A lo largo de este trabajo se describirán detalladamente las propiedades de los sistemas implicados (el eje reproductivo, el sistema olfatorio y generalidades de la PRL), así como la posible relación estrecha que guardan la PRL, el olfato y la fisiología sexual, que hasta ahora está apoyada con pocas evidencias.

## ANTECEDENTES GENERALES

### Maduración sexual

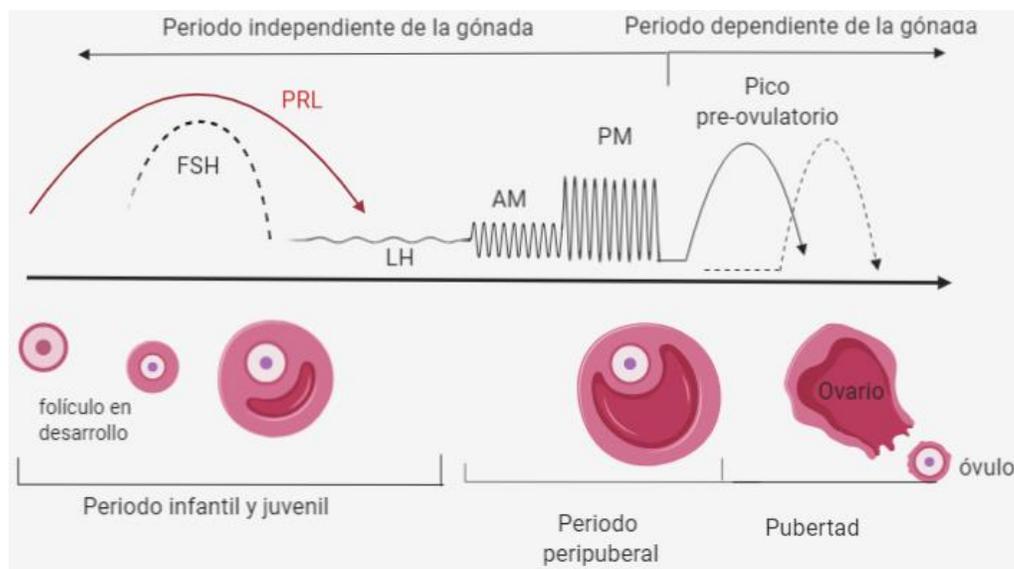
Durante el periodo previo a la pubertad (etapa infantil/juvenil) en los mamíferos la actividad de gonadotrópos en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (HHG) es la encargada de la liberación de FSH. En la etapa juvenil la liberación de FSH disminuye conforme se alcanza la madurez sexual, y el eje HHG comienza a hacerse sensible a la liberación de estradiol que el ovario comienza a secretar hasta este periodo. Aunque la estimulación no ha sido muy alta, comienza a haber una retroalimentación positiva del eje (Gilbert, 2005; Prevot, 2014).

En etapas peripuberales, los cambios en los pulsos de liberación de LH son importantes para el desarrollo de los ovarios, estimulándolos para producir estradiol y progesterona. A su vez, la liberación de LH se ve favorecida por los cambios en la producción de estradiol. En esta etapa existe una liberación diferencial de FSH y LH, debido a que tienen una sensibilidad distinta a las pulsaciones de GnRH; FSH responde a pulsaciones de menor frecuencia y LH lo hace a mayor frecuencia (Dalkin *et al.*, 1989; Prevot, 2014). En ratas, la secreción de LH es pulsátil también en la transición juvenil-prepuberal, incrementando durante el día conforme el animal se acerca a la pubertad (Fig. 1).

Hay diversas moléculas que influyen la actividad de las neuronas que secretan GnRH, como el glutamato, el ácido gamma aminobutírico (GABA), la norepinefrina, la dopamina (DA), el neuropéptido Y, los opioides endógenos, la melatonina y kisspeptina (Terasawa & Ojeda, 2009). El momento en que el ovario es capaz de secretar altos niveles de estrógenos en un periodo corto, es un evento clave para que se eleven los niveles de FSH/LH/GnRH preovulatorios. Los cambios en los estrógenos son indispensables para activar el eje HHG al estimular los receptores de estrógenos localizados en las neuronas kisspeptidérgicas, que, a su vez, estimularán a las neuronas de GnRH para promover la posterior liberación de FSH y posteriormente el pico preovulatorio de LH; en esta etapa los cambios en las gonadotropinas están mediados por una activación del eje HHG completamente dependiente de las hormonas del ovario (Prevot, 2014). Además, la liberación de gonadotropinas está altamente regulada por la innervación de neuronas kisspeptinérgicas, que en los roedores, se encuentran principalmente en el núcleo anteroventral periventricular del hipotálamo (AVPV) y en el núcleo arqueado (ARC) (Terasawa, E. & Ojeda, S. 2009). El péptido kisspeptina y su interacción con el receptor GPR54 modulan esta retroalimentación hormonal (de Roux *et al.*, 2003). Mutaciones en el gen del receptor pueden

producir pérdida de la función del GPR54 y generar hipogonadismo hipogonadotrópico en ratones (Seminara *et al.*, 2004).

En ratas, además de la estimulación por LH y FSH en la maduración del ovario, el desarrollo prepuberal del mismo está influenciado por la actividad de otras hormonas que pueden estimular la respuesta a estrógenos del ovario, como la hormona de crecimiento (GH) y la PRL (Terasawa, E.; Ojeda, 2009). El desarrollo de los folículos está promovido por la señalización de los diferentes receptores de PRL (Russell & Richards, 1999). Los niveles de GH en suero aumentan en una retroalimentación positiva con las hormonas esteroideas, además de que su incremento está relacionado también con el crecimiento corporal general. Su incremento llega a ser hasta el doble durante esta etapa prepuberal (Saenger, 2003). Aparte de la influencia hormonal, también se ha descrito que dos neurotransmisores, norepinefrina y el péptido vasoactivo intestinal (VIP) (vía innervación extrínseca) estimulan al ovario. Estos neurotransmisores tienen un efecto estimulador en la esteroidogénesis del ovario (Terasawa & Ojeda, 2009). Entre todos los cambios que ocurren, aproximadamente para el día postnatal 20 (P20), las neuronas GnRH se vuelven particularmente sensibles a la kisspeptina, incluso se le ha atribuido el papel como iniciador de la pubertad y su activación en este sentido es sensible al estado metabólico del organismo (Herbison, De Tassigny, Doran, & Colledge, 2010; Vazquez *et al.*, 2018)



**Figura 1. Perfil hormonal y maduración del ovario de acuerdo con la edad en el ratón.** Fluctuaciones hormonales durante el desarrollo del ovario. Hay un pico de prolactina que promueve la maduración del folículo. Además en la etapa peripuberal, ocurren fluctuaciones de LH con un ritmo pulsátil, el cual es mayor por la tarde que por la mañana, estas fluctuaciones eventualmente inducen el pico preovulatorio de LH. Imagen creada en BioRender.com.

En ratas, la apertura vaginal está asociada con el primer estro que refleja la primera ovulación y la madurez sexual de la hembra; sin embargo, en ratones, la apertura vaginal refleja el inicio de la pubertad, en este momento no ocurre el estro, si no, alrededor de diez días después (Gorski

& Schwartz 1977). El inicio de la pubertad y la maduración sexual son un indicador del aumento en los niveles de estradiol. La madurez sexual está estrictamente correlacionada con la capacidad de poder reproducirse (Prevot, 2014).

Una vez que las hembras alcanzan la madurez sexual comienzan a experimentar periodos de receptividad sexual (periodo de ovulación o celo) de manera cíclica. Esta ciclicidad es conocida como ciclo estral y está comprendido por una fase folicular o estrogénica y una fase luteínica. La fase folicular esta a su vez dividida en proestro y estro, y es la etapa de receptividad (iniciada en el proestro tardío). En el proestro comienza la maduración de los folículos ováricos, en el estro, el folículo maduro libera el ovocito, este proceso es conocido como ovulación. La siguiente fase es la luteínica que está dividida en metaestro y diestro, en el metaestro se forma el cuerpo lúteo posterior a la ovulación. El diestro es la etapa más larga y es una etapa de inactividad sexual en la que el cuerpo lúteo (también llamado cuerpo amarillo) madura y desaparece. El ciclo se repite, cambiando su frecuencia entre especies, en el ratón tiene una duración de 4-5 días (Byers *et al.*, 2012; Caravaca, 2005).

### **Sistema olfatorio**

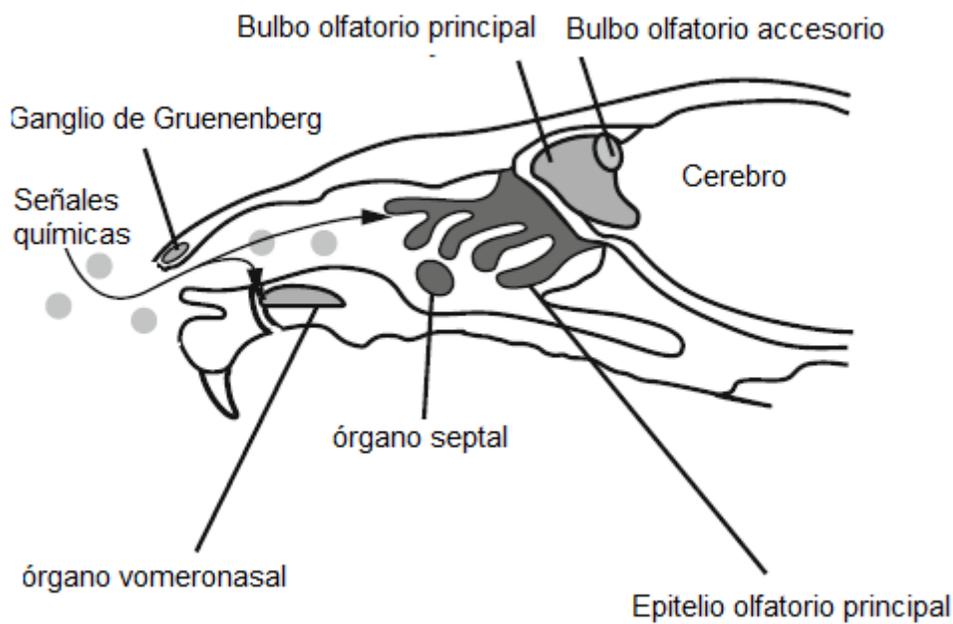
El sistema olfatorio no es una estructura anatómica unificada, si no un grupo de subsistemas, con distinta anatomía, receptores, mecanismos de transducción y proyecciones centrales con la función de detectar moléculas químicas (volátiles y no volátiles) y transducirlas en señales nerviosas. La relevancia del sistema olfatorio radica en sus funciones que van desde la identificación de alimento, del medio ambiente, de conespecíficos, de presas, de depredadores, de parejas potenciales, de madres, de crías, etc. Todas estas funciones vitales ponen al olfato como un sistema de procesamiento de información crítico para la supervivencia y la reproducción (Trimmer & Mainland, 2017). El olfato media la sensibilidad y la recepción de mensajes químicos y pueden proveer información específica dependiendo de la concentración de ciertas moléculas o la combinación específica de las mismas (Wilson, 2006).

El sistema olfatorio en mamíferos está conformado por el sistema olfatorio principal, el sistema olfatorio accesorio, el órgano septal y el ganglio de Grueneberg. Este último sólo ha sido descrito en ratones y está localizado bilateralmente en el vestíbulo nasal, responde a feromonas de alarma y bajas temperaturas (Kensaku, 2016). El órgano septal está en la parte anteroventral del epitelio olfatorio, tiene algunos receptores a odorantes pero su función específica no es clara (Fig. 2) (Kensaku, 2016). En el sistema olfatorio principal, la primera aferencia y componente sensorial proviene de la capa mucosa donde las moléculas odorantes son detectadas por receptores localizados en las neuronas olfativas sensoriales bipolares localizadas en el epitelio olfatorio; sus axones desde la lámina basal atraviesan la placa cribiforme y sus sinapsis conectan con las principales células del bulbo olfatorio principal (BOP). En el sistema olfatorio accesorio,

el órgano vomeronasal (OVN), tiene conexiones con el bulbo olfatorio accesorio (BOA) y funcionalmente se distingue del sistema olfatorio principal en la detección de moléculas que no son volátiles (Lledo *et al.*, 2009; Trimmer & Mainland, 2017). Ambos sistemas difieren también en su conectividad central; las conexiones del BOP van hacia diferentes núcleos como el núcleo olfatorio anterior, la corteza piriforme, el tubérculo olfatorio, la amígdala lateral y la corteza entorrinal, mientras que las fibras del BOA van a la amígdala, posteriormente, al hipotálamo primordialmente (Fig. 3) (Lledo *et al.*, 2009).

El sistema olfatorio accesorio es el que se encarga de la detección, codificación e interpretación de mensajes químicos socialmente relevantes (Breer *et al.*, 2006; Dulac & Torello, 2003; Halpern & Martínez-Marcos, 2003). Tales mensajeros pueden ser feromonas, las cuales son señales químicas que pueden ser proteínas, péptidos o fragmentos de éstos, que transmiten información biológicamente relevante, modulan desde la conducta agresiva y/o sexual hasta procesos neuroendocrinos (Rodríguez & Boehm, 2009). El BOA está organizado funcional y anatómicamente en porción anterior y posterior, recibe desde el OVN información de receptores y proteínas particulares (VR1 y VR2, respectivamente), y el procesamiento de esta información desencadena una activación celular y conductual distinta (Halpern & Martínez-Marcos, 2003). La región anterior responde preferencialmente a estímulos químicos del sexo opuesto, por lo que se le ha atribuido una función relacionada a la reproducción (Kumar *et al.*, 1999), en contraste con la parte posterior que está relacionada con la detección de olores provenientes de un depredador o conspecíficos (animales de la misma especie) que representen un peligro y de mediar conductas agresivas y de defensa (Kumar *et al.*, 1999; McGregor *et al.*, 2004).

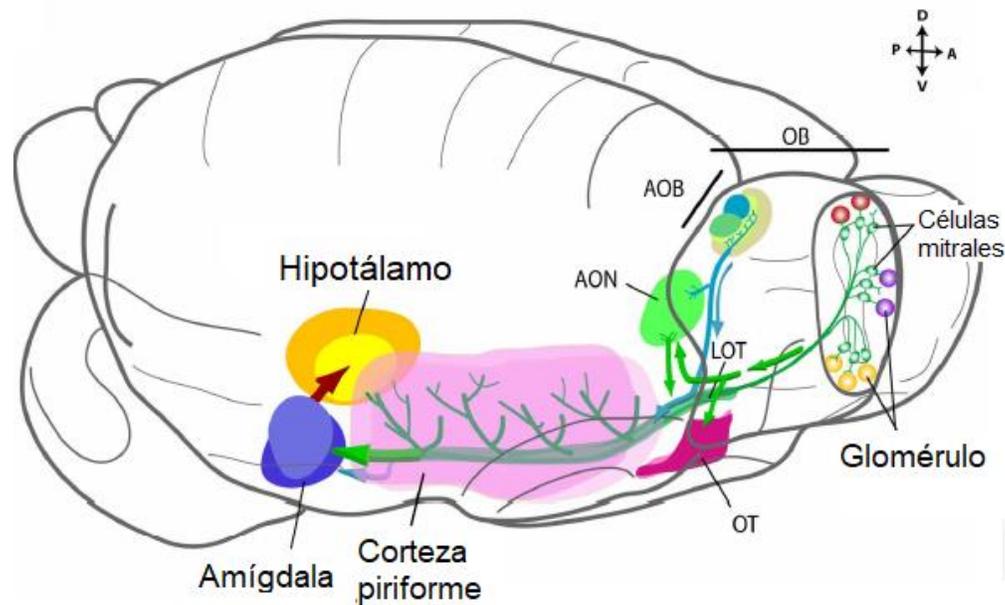
Las dos porciones del BOA tienen proyecciones a diferentes áreas centrales como el núcleo amigdaloides posteromedial cortical (PMCo), complejo amigdaloides medial (MeA) y capas superficiales del núcleo del lecho del tracto olfatorio accesorio (BAOT, por sus siglas en inglés); en algunos mamíferos (como ratas y conejos), se han descrito proyecciones diferenciales; la parte anterior proyecta a la división medial del núcleo del lecho de la estría terminal (BNSTm), la parte posterior proyecta a regiones más profundas del BAOT y el núcleo amigdaloides medial anteroventral (MeAV) (Mohedano-Moriano *et al.*, 2007). Sin embargo, en el ratón, las proyecciones a los diferentes núcleos convergen entre las dos porciones (Von Campenhausen & Mori, 2000). Además algunas regiones centrales que proyectan de manera centrífuga a ambas porciones del BOA son el BAOT, el núcleo del lecho de la estría terminal (BNST), amígdala medial posterodorsal (MePD), y el PMCo que proyecta solo a la parte posterior, pero no a la anterior (Martínez-Marcos & Halpern, 1999).



**Figura 2. Representación sagital de los bulbos olfatorios junto con sus componentes sensoriales, epitelio olfatorio y órgano vomeronasal.** Vía de entrada de las señales químicas, y otros componentes como el órgano septal y el ganglio de Gruenenber. Editada de Kensaku, 2016.

### **Organización celular del BO**

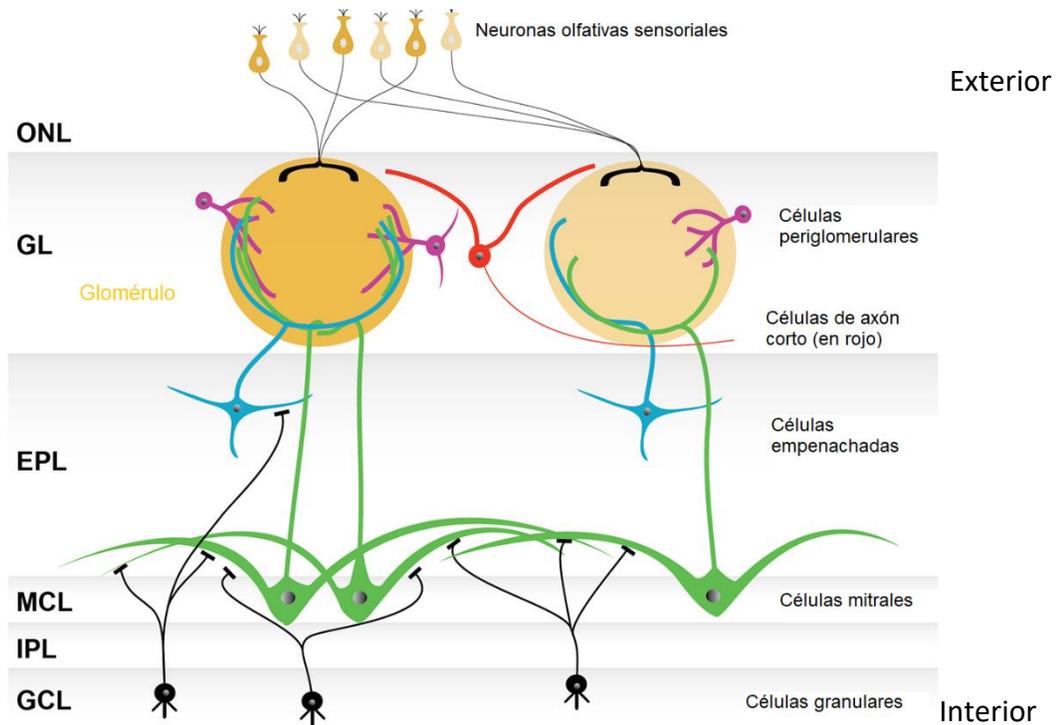
La red neural del BOP está dividida en capas, las cuales son de lo más externo a lo interno: la capa del nervio olfatorio, la capa glomerular, la capa plexiforme externa, la capa de células mitrales (CM) (que son las células principales y de proyección), la capa plexiforme interna, y la capa de células granulares (CG) (Fig. 4). La capa del nervio olfatorio se compone de un epitelio olfatorio que alberga a las neuronas olfativas sensoriales, que están conectadas a los glomérulos de la siguiente capa. Esta estructura está formada por las dendritas apicales de las CM y los axones de las neuronas olfativas sensoriales; ahí mismo, en los glomérulos se encuentran una serie de interneuronas, de las cuales las principales son las células periglomerulares (PG) y las células de axón superficial corto (Nagayama *et al.*, 2014). Las siguientes capas (mitral y plexiforme interna), también tienen diferentes interneuronas como las positivas a parvalbúmina que están recibiendo señales de las CM (cuyos somas están en la capa mitral) y empenachadas (capa plexiforme externa). La CG está conformada por interneuronas con un soma pequeño, aunque también pueden estar en la capa plexiforme interna, donde también se encuentran las de axón corto profundo, que proyectan a diferentes capas del BO (Nagayama *et al.*, 2014).



**Figura 3. Representación de los sistemas olfatorios (principal y accesorio).** Las flechas indican conexión entre las estructuras, verde para sistema olfatorio principal, azul para sistema olfatorio accesorio. La flecha roja indica la conexión entre la amígdala e hipotálamo. OT: Tracto olfatorio, OB: Bulbo olfatorio, AOB: Bulbo olfatorio accesorio, AON: Núcleo olfatorio anterior, LOT: Tracto olfatorio lateral. D; Dorsal, V: Ventral, A: Anterior, P: Posterior. Modificada de Suárez, García-González & de Castro 2012.

La organización celular del BOA es esencialmente la misma que en el BOP; sin embargo, existe una disposición particular, por lo que se ha propuesto la siguiente nomenclatura: capa del nervio vomeronasal, capa glomerular (más densa que en el BOP), capa celular externa, tracto olfatorio lateral, capa celular interna. La capa celular interna une las capas glomerular externa, plexiforme externa y mitral, debido a la disposición celular más heterogénea que existe en el BOA (Fig. 5) (Larriva-Sahd, 2008).

El procesamiento de la información olfatoria es resultado de una compleja red de comunicación entre las CM y las células empenachadas que son las células principales y de proyección del BO, interactuando con un gran grupo de interneuronas (granulares, periglomerulares, de axón corto) que utilizan GABA como su principal neurotransmisor. Existe un balance excitatorio e inhibitorio en las diversas capas del BO (Lledo *et al.*, 2009).



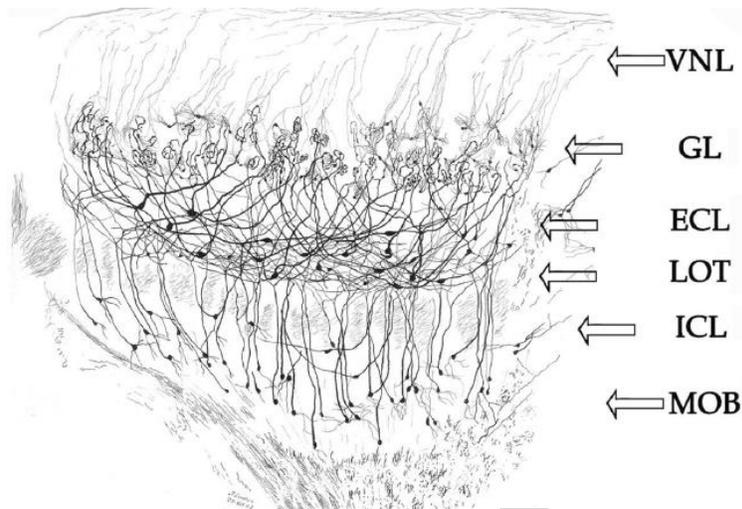
**Figura 4. Organización tisular de las capas que conforman el BOP.** Aferencias provenientes del epitelio olfatorio y conexiones con las células mitrales (células principales de proyección central) e interneuronas formando las estructuras circulares de la primera capa, la glomerular. En la capa plexiforme externa están las células empenachadas, que junto con las células mitrales son células de proyección. Posteriormente los somas de las células mitrales en la capa mitral; seguido de una capa más con las dendritas de las células granulares, y finalmente la capa granular, donde se encuentran los somas de las interneuronas que están regulando la actividad de las células mitrales. ONL Capa del nervio olfatorio. GL capa glomerular, EPL capa plexiforme externa, MCL capa de células mitrales, IPL capa plexiforme interna, GCL capa de células granulares. Modificada de Nagayama *et al.*, 2014.

## Desarrollo del BO

Al momento del nacimiento el BO está casi completo aunque diferentes capas, así como su función, se terminan de establecer en etapas postnatales tempranas. Si bien desde etapas embrionarias se forman las CM, y las interneuronas (granulares, PG y de axón corto), es en etapas posnatales cuando las CG y las PG consolidan sus conexiones y establecen una estructura madura. La maduración funcional de las CG y las PG dentro del BO se completa hasta los días P28 y P42, respectivamente (Lledo *et al.*, 2009; Martín-López *et al.*, 2012; Ravi *et al.*, 2017).

Las capas celulares del BO aumentan su tamaño debido a ajustes sinápticos que ocurren desde el nacimiento y durante la madurez sexual. Una de las regiones que más destacan en su crecimiento es la capa glomerular, ya que las CM aumentan su densidad dendrítica y por ende los glomérulos aumentan su tamaño hasta cuatro veces, desde el nacimiento hasta la semana 12 de vida (Pomeroy, LaMantia, & Purves, 1990). En general el BO aumenta su tamaño hasta un

60% durante el primer año de vida (Platel *et al.*, 2019). Además, las CG que son las células que están siendo constantemente añadidas al BO por el proceso de neurogénesis, durante la etapa postnatal adquieren una morfología típica al acoplarse al circuito; esta morfología comienza a cambiar a una morfología característica adulta después de P40 y no antes (Platel *et al.*, 2019; N. Ravi *et al.*, 2015).



**Figura 5. Estructura transversal del BOA.** Disposición de las capas celulares en el BOA, se puede ver la diferencia que tienen con las capas presentadas anteriormente del BOP, las capas son esencialmente las mismas, sin embargo, parecen tener una estructura o disposición más homogénea en cuanto a la localización de las diferentes células. VNL: Capa del nervio vomeronasal, GL: Capa glomerular, ECL: Capa celular externa, LOT: Tracto olfatorio lateral, ICL: Capa celular interna, y MOB: BOP. Tomada de (Larriva-Sahd, 2008).

## Prolactina y su receptor

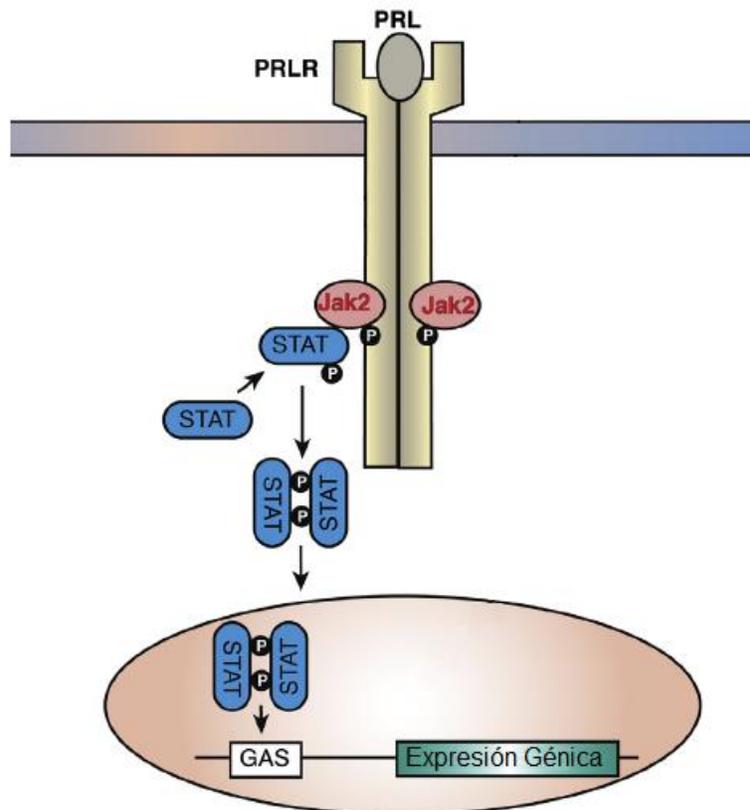
La PRL es una hormona polipéptidica de cadena sencilla que fue descubierta en 1930 por Oscar Riddle (Freeman *et al.*, 2000). La PRL es sintetizada por las células lactotropas de la hipófisis anterior. El gen que codifica para PRL en el humano se encuentra en el cromosoma 6, es de 10 kb, y tiene 5 exones y 4 intrones. El ADN humano tiene 914 nucleótidos, codificando a la prohormona de 227 aminoácidos, el péptido señal tiene 28 aminoácidos, y la hormona madura consta de 199 aminoácidos, arreglada en una cadena sencilla con tres puentes de disulfuro entre seis residuos de cisteína (Cys4-Cys11, Cys58-Cys174 y Cys191-Cys199). El 50% de la cadena de aminoácidos está estructurada en alfa-hélices. La hormona contiene cuatro fragmentos largos alfa hélice dispuestos antiparalelamente. Las modificaciones postraduccionales de la hormona PRL que pueden modificar su actividad biológica son la dimerización, la polimerización, la fosforilación, la glicosilación, la sulfación, y la deamiliación (Freeman *et al.*, 2000). La secreción de PRL está mediada por la actividad de diversos neurotransmisores provenientes del hipotálamo, como la serotonina (5-hidroxitriptamina o 5-HT), DA y GABA y algunos péptidos opiáceos. Su secreción en la hipófisis anterior es inhibida por neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares, cuyos somas se encuentran en el núcleo arqueado del hipotálamo,

mediante la activación de los receptores D2 produciendo un efecto inhibitorio en los lactotrópos (Nemeroff, 2006).

El receptor de PRL (PRLR) es un receptor de la superfamilia de citosinas tipo I que activa predominantemente la vía JAK2-STAT5 (también activa STAT3/STAT1), aunque puede activar otras vías de comunicación intracelular (Gorvin, 2015). El gen que codifica para PRLR está en el cromosoma 5 y contiene al menos 10 exones. A través de *splicing* alternativo se da lugar a isoformas; en ratón se han descrito una isoforma larga y tres cortas, de las cuales la más estudiada es la isoforma larga (PRLR-L) (Bole-Feysot, *et al.*, 1998). En la vía canónica de comunicación intracelular, la unión de la molécula de PRL con un receptor promueve la unión y formación del dímero de receptores, que una vez formado recluta a la proteína JAK2 que posteriormente fosforilará a STAT5 (Fig. 6). Es necesario que existan motivos ricos en prolina en la porción intracelular del receptor y que se lleve a cabo la homodimerización inducida por ligando de receptores dimerizados de PRLR. También este receptor puede activar la vía Ras/Raf/MAP kinasas y c-Src y Fyn (Freeman *et al.*, 2000).

El papel fisiológico de la PRL va más allá de su rol clásico en la glándula mamaria y la producción de leche. La PRL tiene un papel importante en la maduración del ovario, regulando la luteólisis y la secreción de progesterona y en la conducta reproductiva, así mismo, juega un papel importante en el sistema inmunitario, en la osmorregulación y la angiogénesis (Arce, 2006). Son tantas sus acciones emergentes que se ha propuesto como una hormona pleiotrópica, debido a sus diferentes vías de señalización y diversidad en receptores (Freeman *et al.*, 2000).

Debido a que son tantas las funciones que se le han asociado a la PRL y aunado a los diferentes efectos intracelulares (por la variedad de isoformas y vías de señalización que activa), no se conoce a profundidad el efecto que induce en la membrana o en la actividad celular en el SNC (Belugin *et al.*, 2013). Se sabe que produce una rápida activación en las neuronas tuberoinfundibulares del arqueado, favoreciendo la entrada de Ca<sup>+</sup> y así una rápida despolarización (Georgescu, Ladyman, Brown, & Grattan, 2020; Lyons, Hellysaz, & Broberger, 2012). Sin embargo la vía clásica es la de JAK2-STAT5 y generalmente está asociada con una respuesta más lenta y de largo plazo, ya que esta vía promueve la expresión de diferentes genes. Esto es debido a que la isoforma más abundante del receptor es la larga (la que promueve la vía STAT5), y su expresión se ha descrito más en el SNC (Cabrera-Reyes, Limón-Morales, Rivero-Segura, Camacho-Arroyo, & Cerbón, 2017). Por otro lado, de la isoforma corta (de neuronas del trígemo en ratas), se encontró que promueve la vía PI3K o PKC, e incluso la co-expresión de ambas isoformas puede llegar a producir una inhibición entre ambas (Belugin *et al.*, 2013).



**Figura 6. Mecanismo de activación del PRLR.** En la vía canónica de señalización de PRLR, La dimerización del PRLR recluta a la proteína cinasa *Janus kinase 2*, que, a su vez, fosforila a la proteína STAT, la cual se dimeriza y promueve la transcripción de nuevos genes y llevar a cabo la síntesis de proteínas. Modificada de Grattan & Tissier, 2015.

## ANTECEDENTES DIRECTOS

Se ha encontrado la expresión de PRL y PRLR en regiones cerebrales como el BO, la corteza cerebral, el cuerpo calloso, los plexos coroideos, el BNST, varias regiones del hipotálamo, el hipocampo, el tálamo, la amígdala, los ganglios basales, el núcleo rafé y el cerebelo; se sugiere que la hormona participa en procesos de neurogénesis, sueño, aprendizaje y memoria, además se ha visto que tiene un efecto neuroprotector. Inclusive se ha propuesto que tiene un papel en el desarrollo embrionario en diferentes órganos (Bridges & Grattan, 2018; Cabrera-Reyes *et al.*, 2017; Goffin *et al.*, 2002; Morales, 2011).

En el año 1996, Freemark y cols., mediante hibridación *in situ*, RT-PCR e inmunohistoquímica, observaron la expresión de PRLR (ambas isoformas) en el BO de ratas desde etapas embrionarias (E), alrededor del E18, mostrando una alta expresión en el neuroepitelio periventricular, y en las las CM y las células empenachadas del BO. En etapa postnatal, alrededor del día P5 encontraron igualmente una alta expresión del PRLR en estas mismas células además del núcleo olfatorio anterior y la corteza piriforme, que son estructuras que forman parte del

sistema olfatorio. La PRL tiene un papel importante como hormona lactogénica y podría estar regulando la interacción entre madre y crías, ya que también se ha encontrado ARNm de PRLR en la CM de ratas lactantes (Freemark *et al.* 1996). Este receptor podría estar participando en el desarrollo no solo del olfato, si no de diferentes tejidos, como se ha descrito en el humano (Freemark *et al.*, 1997). En el caso de la PRL, sólo ha sido encontrada en el BO de ovejas mediante RT-qPCR (Cabrera-Reyes *et al.*, 2017). Actualmente no hay información disponible respecto a la expresión de esta hormona en el BO de ratones, que nos indique que esté llevándose a cabo una síntesis local, como en otras regiones.

Los mecanismos por los cuales la PRL ingresa al sistema nervioso central no son claros. Canónicamente la entrada es vía transporte mediado por receptor (Bole-Feysot *et al.*, 1998), sin embargo se ha encontrado que puede ingresar independientemente de la presencia del receptor (Rosemary S.E. Brown *et al.*, 2016) posiblemente por vía vascular. Este proceso podría ser promovido dependiendo de la condición fisiológica, ya que se ha encontrado que en algunas condiciones patológicas la concentración de PRL en el líquido cefalorraquídeo aumenta considerablemente (Tani *et al.*, 2018), y que incluso la inhibición farmacológica de PRL puede aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, y por tanto comprometer la integridad del SNC (Rosas-Hernández, *et al.*, 2015).

### **Prolactina, olfato y reproducción**

Las señales olfatorias que activan al sistema olfatorio accesorio pueden modular procesos neuroendocrinos en el hipotálamo relacionados con la reproducción (Hashikawa *et al.*, 2016; Yoon *et al.*, 2005). Esto es a través de las neuronas kisspeptinérgicas de la amígdala y del hipotálamo que responden a estímulos olfatorios sexualmente relevantes que pueden regular tanto al eje reproductivo como a la conducta sexual (Hellier *et al.*, 2018; Pineda *et al.*, 2017). La región anterior del BOA está principalmente enfocada en la detección de los estímulos sexuales y/o sociales, y posteriormente se activan el resto de las regiones centrales que forman parte del sistema olfatorio vomeronasal (Kumar *et al.*, 1999; McGregor *et al.*, 2004).

Las feromonas de los machos pueden alterar la maduración sexual de las hembras, el mantenimiento de la peñez, promover la neurogénesis del BO y la supervivencia de estas nuevas células (Bruce, 1960; Mak *et al.*, 2007; Oboti *et al.*, 2017; Vandenberg, 1969) y se cuenta con reportes acerca de la participación de la PRL en estos procesos. Por ejemplo, en el llamado efecto Bruce que ocurre en ratones, en donde en hembras preñadas, al percibir las señales olfativas de un macho diferente con el que copularon, se produce una interrupción en la preñez (Bruce, 1960; 1959). Este efecto parece ser debido a que las señales olfatorias codificadas tanto

por el BOA como por el BOP incrementan los niveles de DA, y en consecuencia ocurre una inhibición en la liberación de PRL, que es fundamental para mantener la implantación. El incremento en los niveles de DA promueve un aumento en la actividad de las neuronas tuberoinfundibulares, modulando la liberación de PRL a la baja a través de la activación de los receptores D2 en los lactotopos (Rosser *et al.*, 1989; Serguera *et al.*, 2008).

En la neurogénesis del BO, por ejemplo, la PRL en ratones hembra vírgenes promueve la proliferación en la zona subventricular (ZSV), de modo que se genera un mayor número de células nuevas que migrarán al BO para incorporarse en sus circuitos. Este efecto ocurre igualmente en ratonas madres (en etapas específicas de la preñez y posteriores al parto) (Shingo *et al.*, 2003). Esta proliferación celular en ZSV e incorporación de nuevas células al BO también puede inducirse por la exposición de feromonas de los machos, y este efecto también está siendo regulado, en gran medida, por el PRLR (Mak *et al.*, 2007).

La PRL y algunas señales olfatorias clave (juntas o aisladas) también son importantes durante la maduración sexual, como se ha descrito en el efecto Vandenberg (Vandenberg, 1974; 1969). Este efecto consiste en la aceleración del inicio de la pubertad en hembras que son expuestas a feromonas de los machos. Esta interacción de las hembras en etapas peripuberales con feromonas de machos puede incluso promover la preferencia dirigida a los olores de los machos durante la etapa adulta (Jouhannau, Cornilleau, & Keller, 2014). En ratas hembra, coincidentemente durante la etapa peripuberal, se ha descrito un aumento de los niveles de PRL que comienza a partir del día 37 (Döhler & Wuttke, 1974).

En ratas, las lesiones en el OVN pueden inhibir el efecto Vandenberg, y este efecto a su vez puede revertirse con la administración de bromocriptina (agonista de receptores D2) en el día 26, pero no en el 23. Sin embargo, existe un efecto paradójico, ya que el aumento de PRL producido al administrar domperidona (antagonista de receptores D2), no retrasa el inicio de la pubertad, e incluso se ve adelantada comparada con los grupos *sham* (Lomas & Keverne, 1982). La administración de PRL en la eminencia media en el día P23 tiene también un efecto acelerador en la pubertad, la cual no involucra cambios en los niveles de gonadotropinas (Advis, J. P; Andrews, 1982).

En otros experimentos en ratas prepúberes con implantes de hipófisis de ratas tanto adultas como inmaduras se observa la aceleración de la pubertad, pero solo en las que reciben la hipófisis de ratas maduras ocurre un incremento de PRL (Gonzalez *et al.*, 1986; Gonzalez, L, & Aguilar, 1983). La población de células kisspeptinérgicas del ARC (las cuales modulan a las neuronas GnRH) (Gottsch *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2005) responden a la administración de PRL a través de la vía de STAT5; en experimentos con animales prepúberes, se ha demostrado que

la activación de esta vía tiene un efecto inhibitor en el inicio de la pubertad (Silveira *et al.*, 2017). De manera interesante, en nuestro laboratorio observamos que la administración crónica de PRL durante la etapa juvenil retrasa el inicio de la pubertad en ratones hembra, además de interferir con la respuesta de actividad basal (evaluada con la inmunorreactividad a c-Fos, marcador de activación celular) en las células granulares ante un estímulo sexualmente relevante (Corona *et al.*, 2020). En su conjunto, todos estos antecedentes sugieren que la PRL participa en la maduración fisiológica de las hembras.

## **JUSTIFICACIÓN**

La expresión de los PRLR se ha encontrado principalmente en la CM del BO durante el desarrollo embrionario y durante la lactancia, sugiriendo que su activación podría estar involucrada en procesos determinantes tanto de la maduración sexual y eventos reproductivos. Aunado a esto, existe evidencia de que la regulación de la PRL por el procesamiento de olores promueve alteraciones neuroendocrinas en el eje reproductivo. Además de que se ha reportado la expresión de PRL local en diferentes zonas del SNC. Este trabajo contribuye con datos que aportan al acervo de información (poco abundante) de los mecanismos básicos por los cuales la PRL se relaciona con el olfato (principalmente a través de la activación del BOA-anterior); contribuye también con información que se explora por primera vez, como la expresión de *Prl* y su receptor *Prlr-I*, en contexto de la maduración sexual y otros estadios reproductivos de la hembra.

## **HIPÓTESIS**

1. Los genes *Prl* y *Prlr-I* se expresan en el BO durante cada una de las diferentes etapas relacionadas con la maduración sexual en el ratón hembra.
2. La administración de PRL exógena aumenta la activación celular del BOA anterior ante un estímulo sexualmente relevante.

## **OBJETIVO PRINCIPAL**

Determinar los niveles de ARNm de *Prl* y de *Prlr-I* en el BO durante la maduración sexual del ratón hembra y evaluar la activación celular en el BO inducida por un estímulo olfatorio sexualmente relevante tras un tratamiento agudo de PRL.

## Objetivos específicos

1. Determinar y cuantificar por qPCR los ARNm para *Prlr-I* y *Prl* en el BO, en diferentes etapas de la maduración sexual y experiencia reproductiva de la hembra.
2. Evaluar mediante la expresión de c-Fos (marcador de activación celular), si la administración aguda de PRL en ratones adultas modifica la activación de las CM y CG del BOA ante un estímulo olfatorio sexualmente relevante.
3. Evaluar la expresión de c-Fos en las CM y CG de las regiones anterior y posterior del BOA ante un estímulo olfatorio sexualmente relevante.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Sujetos

Se utilizaron ratones hembra silvestres de la cepa C57BL/6 de diferentes edades y condiciones fisiológicas: inicio de pubertad (IP), maduración sexual (MS), adultas vírgenes (AV) y adultas lactantes (AL). Los ratones se obtuvieron del Bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Todos los animales se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad invertida de 12h/12h, con agua y alimento *ad libitum*, temperatura de 21 °C y humedad controlada a 32%. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la UNAM Campus Juriquilla con el proyecto 049 y 104. Siguiendo los Lineamientos de la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y uso de animales de laboratorio (**NOM-062-Z00, 1999**).

### Diseño experimental.

#### Caracterización de la expresión de *Prl* y *Prlr-I*

Se le dio un seguimiento específico (explicado detalladamente más adelante) a cada hembra dentro de los grupos mencionados previamente: IP, MS, AV y AL para determinar que se encontraran en las etapas de interés y así sacrificarlas para la evaluación por qPCR.

Se utilizaron cuatro grupos de hembras de la cepa C57BL/6 como se explica a continuación.

### **Grupos.**

#### Inicio de la pubertad (IP)

Para este grupo se seleccionaron 15 ratones hembras de 21 días de edad, recién destetadas (P21) y se hicieron seguimientos de la estructura externa de la vagina mediante observación, determinando el inicio de la pubertad por la apertura vaginal (Gorski Firlit & Schwartz, 1977). Alrededor del día P30-35.

#### Madurez sexual (MS)

Este grupo se determinó por el primer estro de 15 hembras, el cual fue identificado mediante un seguimiento de los cambios citológicos-vaginales que ocurren de manera cíclica durante el ciclo estral. Una vez establecida la apertura vaginal, todos los días, a la misma hora (11:00 am), se hicieron lavados vaginales con agua desionizada para evaluar bajo el microscopio óptico la citología vaginal. El primer estro se determinó cuando se encuentre en la muestra tomada del lavado vaginal la mayoría de las células cornificadas, indicando que la primera ovulación ya ocurrió (Byers *et al.*, 2012; F. Nelson *et al.* 1990a; b). Esto ocurre aproximadamente 10 días después de la apertura vaginal (P40-45).

#### Adultas vírgenes (nulíparas; AV)

Se seleccionaron 10 hembras adultas de 12-13 semanas de edad, sacrificadas en la etapa en la que presentaron el estro. Un grupo alterno de estas hembras (19 sujetos) se utilizó para la exposición olfatoria, el cual se detallará más adelante (Carlitz *et al.*, 2019; Drickamer, 1983).

#### Adultas lactantes (primíparas; AL)

Para este grupo se utilizaron 10 hembras adultas primíparas-lactantes, de 12 a 16 semanas de edad, se sacrificaron en el día 3 posterior al parto, debido a que es durante los primeros 5 días de lactancia el momento que los niveles de PRL se encuentran más altos (Anderson, S. M. *et al.* 2014).

#### *Niveles del ARNm de Prlr-1 y de Prl*

Para la cuantificación de la expresión del *Prlr-1* y de *Prl* se usó tejido fresco de las regiones de interés. Se obtuvo el cerebro fresco del animal sacrificado por decapitación, se extrajo el BO como principal tejido de interés, y adicionalmente se extrajo el ovario para utilizarlo control positivo. El tejido extraído se almacenó en 1 mL de solución TriZol (Invitrogen), agente que permite mantener el ARN íntegro durante la lisis celular. Una vez homogenizado, se agregaron 200µL de cloroformo y se centrifugó a 10,000 rpm durante diez minutos; el sobrenadante se recuperó para extraer el ARN total con un kit comercial (Zymo Research). La cuantificación del ARN se hizo con un espectrofotómetro (Nanodrop Thermofisher Scientific), donde se verificó la concentración y pureza del ARN para poder proceder con la síntesis del ADNc. Se mezcló en un tubo libre de nucleasas 1µL de cada uno de los siguientes reactivos: *random primers*, ARN total,

mix de 10mM de dNTPs; llevó a volumen final de 12µL con agua libre de nucleasas. Esta mezcla se incubó a 65°C durante 5 min, posteriormente se provocó un choque térmico en hielo, seguido de un pulso de centrifugación. Posteriormente se añadieron 4µL de buffer de primera hebra 5X, 2µL de ditiotreitol 0.1 M y 1µL de inhibidor de ribonucleasas. Esta segunda mezcla se incubó por 2 minutos a 37°C, para posteriormente añadir 1µL de retrotranscriptasa de virus de leucemia murina moloney M-MLV. Una vez añadida la retrotranscriptasa se incubó 10 min a 25°C, 50 min a 37°C, 70°C durante 15 minutos para detener la reacción. Para la reacción de qPCR, se añadió en un microtubo 5µL del máster mix de SYBR Green (Thermofisher Scientific), 0.5µL de *forward primer*, 0.5µL *reverse primer*, 1µL de agua libre de nucleasas y 3µL de ADNc en dilución. Se incubó la muestra por 2 minutos a 94°C para desnaturalizar. Llevando a cabo 40 ciclos de PCR. Los oligonucleótidos cebadores utilizados para la isoforma larga de *Prlr-I* fueron *forward* (5' a 3'): ACC TGC ATC TTT CCA CCA GTT y *reverse* (5' a 3'): CCA GAG TCA CTG TCG GGA TCT. Estos cebadores son específicos para la isoforma larga del receptor. Para *Prl*, se usaron los siguientes cebadores, *forward*: ACC CTG ATC CTC AGT TTG TGT y *reverse*: CTC CAA TCT CTT TGG CTC TTG. Como gen constitutivo se identificó la expresión de la unidad 18S del ribosoma.

Es importante mencionar también que se hicieron pools de animales, para obtener una lecturas de concentración de ARN suficientes para llevar a cabo la PCR. Los animales de edad adulta se organizaron en pools de dos animales, y los más jóvenes, en pools de tres.

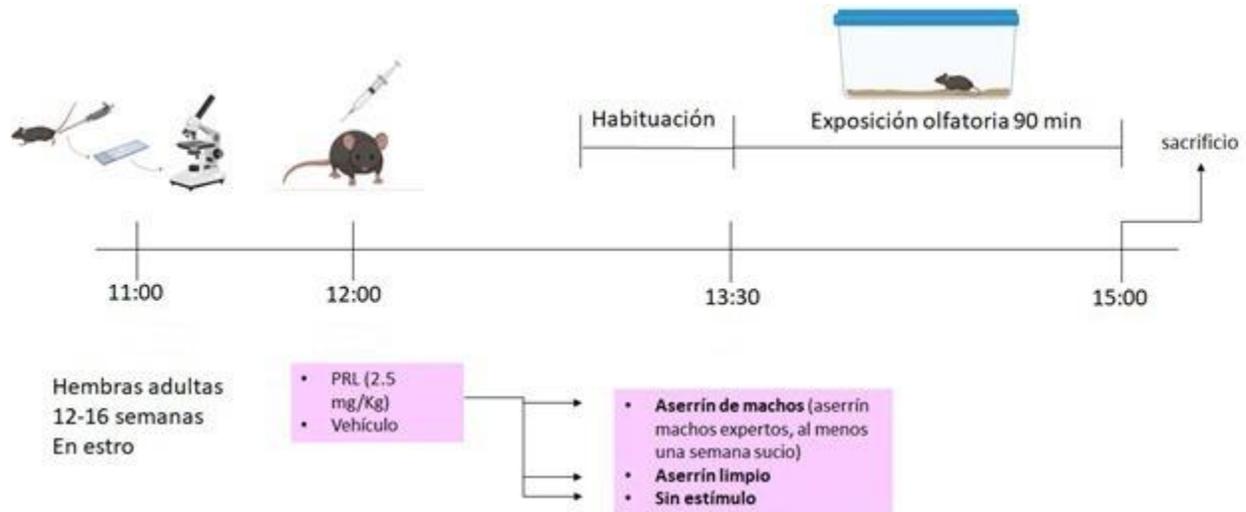
#### *Análisis de los datos obtenidos por qPCR*

Los datos fueron analizados en el software Excel (Microsoft Office 365) realizando los cálculos de acuerdo con el método de cuantificación para datos de qPCR *2-delta delta ct method* (Schmittgen, T. D., & Livak, K. J., 2008).

### **Administración aguda de PRL, exposición olfatoria a un estímulo sexualmente relevante y cuantificación de la activación celular por expresión de c-Fos**

Esta prueba se hizo con el fin de determinar la activación celular inducida por PRL y la exposición olfatoria a un estímulo sexualmente relevante. Se le dió seguimiento a la ciclicidad, presentando el estímulo olfatorio en el día del estro. El estímulo utilizado fue aserrín donde vivieron (al menos una semana) machos expertos (o sea que ya han copulado varias ocasiones) y como control aserrín limpio; el estímulo se presentó durante 90 minutos. Los animales recibieron una administración de PRL ovina (2.5 mg/kg) y vehículo (solución salina 0.9% NaCl) vía i.p., 1:30 h antes del estímulo olfatorio para evaluar el efecto de la administración aguda. Treinta minutos antes del estímulo los animales se habituaron a la caja (Fig. 7). Finalmente, y posterior al estímulo, los ratones se perfundieron (como se describe en la siguiente sección) para obtener el

tejido para inmunohistoquímica para c-Fos y cuantificar la activación en las diferentes capas del BOA (proceso descrito en siguiente sección). Adicionalmente, los animales fueron videograbados durante la exposición para hacer un análisis de la conducta exploratoria y la permanencia en el estímulo de cada grupo.



**Figura 7. Cronograma del protocolo de estimulación olfatoria.** Se observa el tiempo entre cada paso y los criterios de selección de individuos para el experimento, donde a animales dentro del rango de edad, se les hacen lavados vaginales para determinar la fase de estro. Una hora después reciben la administración de vehículo o PRL ovina. Pasado una hora los sujetos se habitúan durante treinta minutos al estímulo olfatorio correspondiente. Los ratones expuestos son sacrificados posterior a los 90 minutos de exposición olfatoria, salvo los ratones del grupo de no estimulados que permanecen en su caja habitación hasta pasadas tres horas. Imagen hecha con Biorender.com.

### *Localización de c-Fos en tejido por inmunohistoquímica*

#### Obtención del tejido

El marcaje inmunohistoquímico para c-Fos se realizó en secciones sagitales de BO que se obtuvieron a partir de tejido perfundido y post-fijado. Previo a la perfusión, los ratones se anestesiaron con pentobarbital (Pisa Pharmaceutical: 6.3% de pentobarbital sódico), inyectando vía i.p. 100 mL/kg. La perfusión se realizó exponiendo la cavidad torácica e insertando una aguja en el ventrículo izquierdo que está vinculado a la arteria aorta que suministraría al cuerpo sangre oxigenada. Se suministró con ayuda de una bomba peristáltica el buffer de fosfatos 0.1 M (PBS: 500 mL de agua desionizada, 115 mL de 0.2 M sodio fosfato monobásico y 385 mL de 0.2 M sodio fosfato dibásico; por litro de solución) limpiando de sangre el sistema circulatorio y posteriormente se perfunde con una solución fijadora de paraformaldehído (PFA) al 4% en agua desionizada. Una vez iniciada la perfusión se cortó la aurícula izquierda para que la sangre tuviera flujo de salida. Se extrajo el cerebro y se dejó en post-fijación durante 24 h en la misma solución de PFA 4%. Pasado este tiempo se cambió la solución a sacarosa al 30% para crioprotección del tejido. Los cerebros se cortaron sagitalmente en un microtomo de congelación (Leica SM 2000R), en rebanadas de 30  $\mu$ m de grosor y se colectaron a cuatro series de todo el

cerebro, para facilitar el manejo de la rebanada. Los tejidos se organizaron en cuatro pozos de cajas de cultivo celular. Los cortes se almacenaron sumergidos en solución anticongelante (sacarosa 30%; etilenglicol 60%; diluido en PBS 0.5M) a -20°C hasta ser procesados para inmunohistoquímica.

#### *Protocolo de inmunohistoquímica*

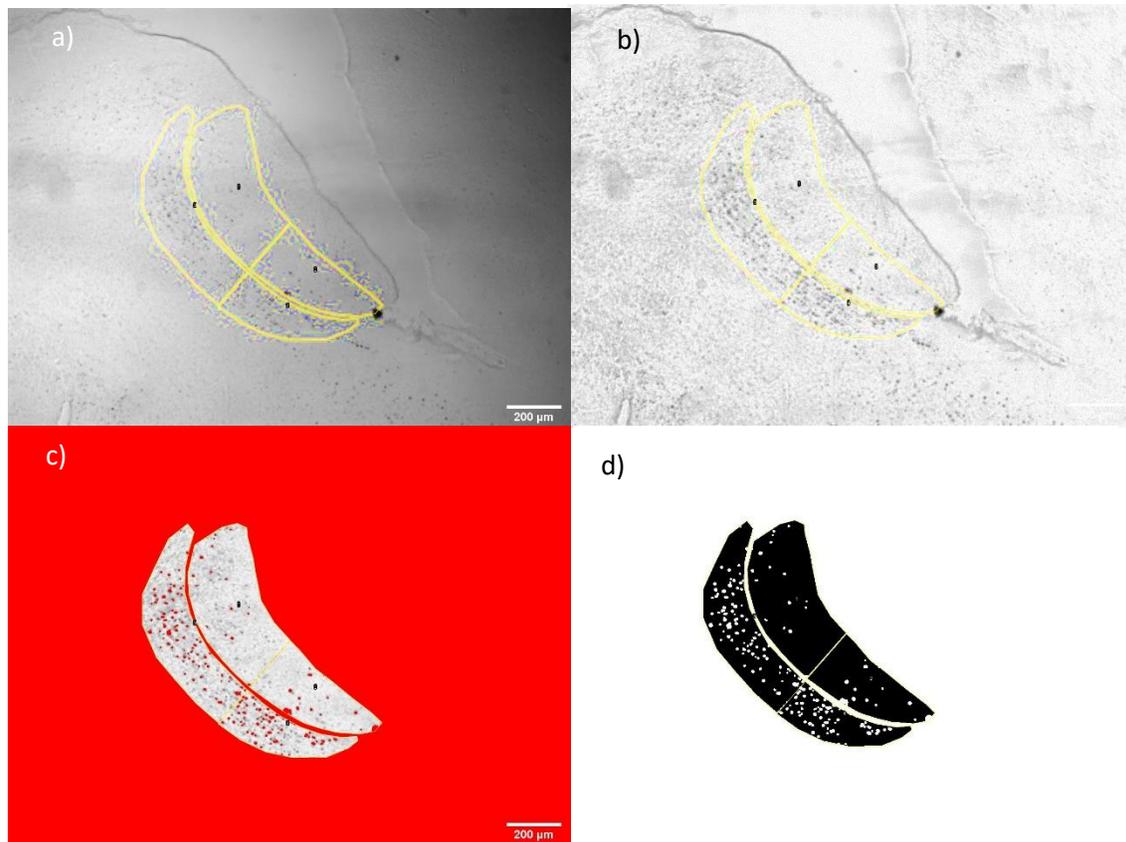
El marcaje de c-Fos se realizó mediante un protocolo de inmunohistoquímica por flotación, en donde las secciones sagitales de BO se lavaron inicialmente 2 veces por 10 minutos con solución de buffer de fosfatos salino con potasio 0.02 M (KPBS: fosfato potasio monobásico 0.04%; fosfato potasio dibásico 0.3%; NaCl 0.9%, disuelto en agua desionizada) para eliminar los residuos de la solución de anticongelante donde se encontraban almacenadas. Posteriormente, se incubaron con una solución de peróxido de hidrógeno al 1% en agua desionizada durante 10 minutos. En el siguiente paso las secciones de tejido se incubaron con borohidrato de sodio al 1% en KPBS que se utiliza para eliminar aldehídos libres en el tejido por el tratamiento de la fijación. Se lavó nuevamente con KPBS hasta que las burbujas (y por lo tanto los residuos de borohidrato) desaparecieran. Se incubó el anticuerpo primario (1:10,000 c-Fos SC-52, Santa Cruz Biotechnology) en una solución en KPBS + Tritón 1% durante 1 hora a temperatura ambiente y 48 horas a 4°C. Una vez pasado este tiempo, se realizaron dos lavados de 10 min KPBS para lavar el exceso de la solución del anticuerpo primario. El anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo (BA-1000, Vector) en KPBS + Tritón al 1% se incubó durante 2 h. Se lavó nuevamente con KPBS (2 veces por 10 min) se incubó con solución que permitirá la formación del complejo avidina biotina peroxidasa (solución ABC) durante 1 h. La solución ABC se preparó en KPBS: 30 mL con 14 µL de solución A y 14 µL de solución B. Esta solución tiene gran afinidad de unirse al anticuerpo secundario biotinilado. Se hicieron dos lavados de diez minutos con KPBS. Se enjuagó con buffer de acetato de sodio 0.1 M con pH de 6.0 dos veces durante 10 min, y se preparó para el revelado con 3,3'-diaminobezidina (DAB). La solución de revelado se incubó hasta que el complejo cambió de color debido a la reacción provocada con el tratamiento con ABC, durante aproximadamente 20 min. La reacción se detuvo con buffer de acetato de sodio al 0.1M con pH de 6.0, haciendo tres lavados con esta misma solución durante 5 min. Después tres lavados más con KPBS de 5 min., se montaron los tejidos en laminillas gelatinizadas.

Antes de cubrir las laminillas se dejaron secar una noche, luego se pasaron por un tren con agua desionizada (5 min.), alcohol al 50%, 70%, 95% y 100% para deshidratación (3 minutos cada cubeta con alcohol) y xileno para remover grasas (5 minutos), finalmente el tejido se cubrió con un cubreobjetos con medio de montaje (Entellan, Merck).

### *Cuantificación de células positivas para c-Fos*

Una vez realizados los marcajes por inmunohistoquímica, se obtuvieron imágenes en el microscopio (Axio Scope A1 Carl Zeiss) con ayuda del software Zen Lite 2011 (Zeiss) bajo el objetivo de 5x.

Se utilizó el programa Fiji de ImageJ (NIH) para la cuantificación de la inmunoreactividad a c-Fos. Se hicieron delimitaciones de las áreas de interés (ROI, por sus siglas en inglés) (Fig. 8), donde se seleccionó la capa de CM y CG además la división anterior y posterior de las mismas. Tomando como referencia la *línea alba* de la capa glomerular (de acuerdo con Larriva-Sahd, 2008) para hacer la distinción entre anterior y posterior. Una vez teniendo seleccionadas las áreas, se hizo sustracción del fondo (Fig. 8), seguido de un ajuste en el contraste donde se seleccionaron valores homogéneos en todas las imágenes (rango de negros/blancos 100-150/255). Se seleccionó la opción de *Gray morphology* para delimitar de manera más clara y en forma circular las regiones más oscuras en la imagen, con el fin de facilitar la detección de las células en el umbral. Después se llevó a cabo una eliminación de bordes exteriores al ROI, para que el programa mostrara únicamente las áreas seleccionadas y fuera más fácil seleccionar el umbral (Fig. 8). Los rangos del umbral utilizados en las imágenes estuvieron entre el 100 y el 150 (igual que en el contraste). En la sección de procesos se utilizó la opción de *Binary* para binarizar los colores de la imagen (Fig. 8), y en el mismo apartado las opciones de dilatar (para hacer más grandes todos los puntos) y *watersheed* para hacer separación de clústers.



**Figura 8. Procesamiento de imagen para conteo de núcleos. (A)** Selección de ROI's **(B)** Sustracción de fondo y ajuste de morfología de grises **(C)** Selección de umbral. **(D)** Binarización y separación de clústers.

Finalmente se utilizó la herramienta de conteo de partículas, seleccionando previamente un ROI a la vez. Los valores obtenidos por esta herramienta fueron los que se tomaron como número de conteo celular. Además cabe destacar que la separación de clústers se hizo únicamente bajo el criterio y capacidad que tiene el programa para poder identificar células individuales. Las células que el programa no identificó como dos (o más), se contaron como una.

#### *Análisis de exploración del estímulo olfatorio*

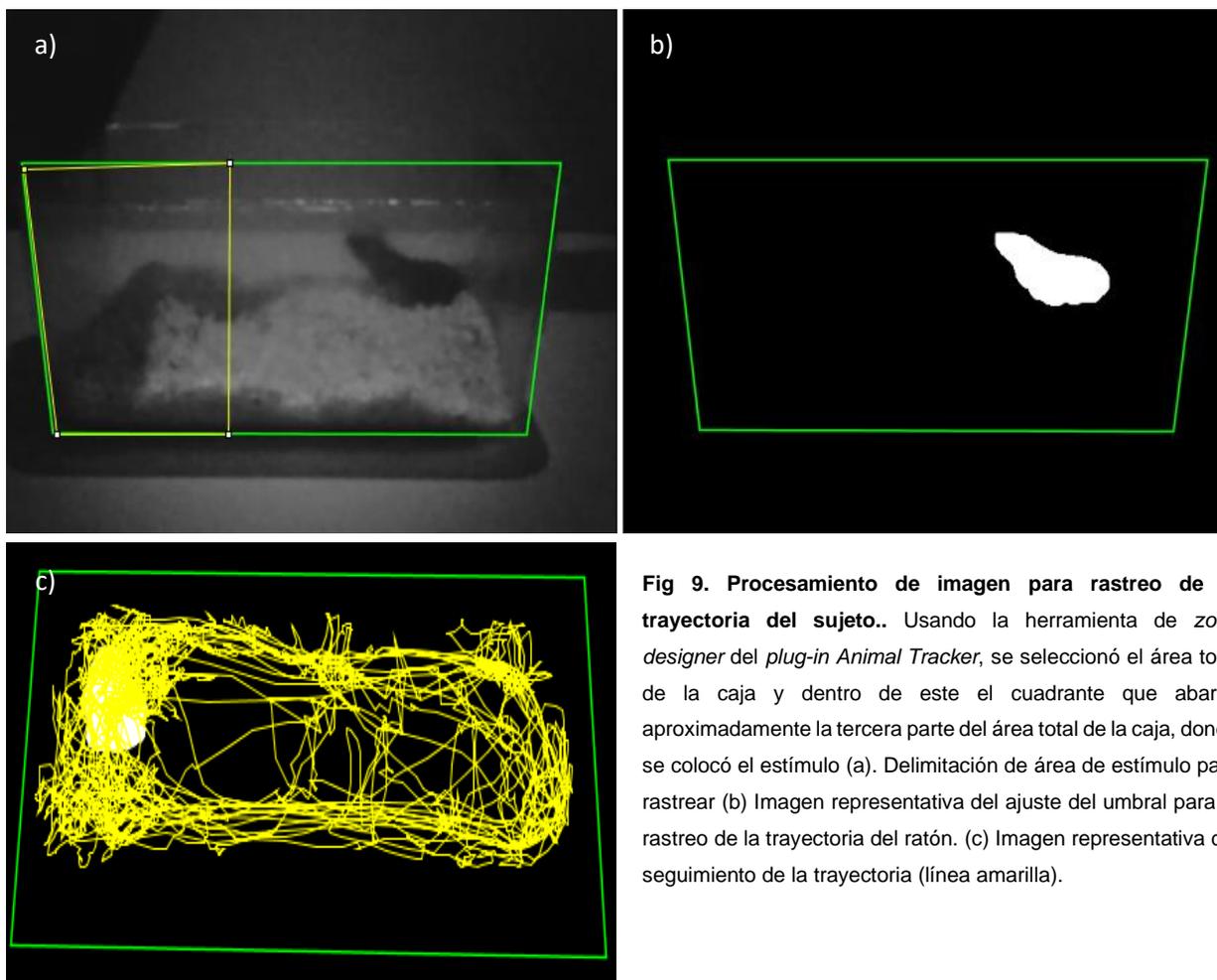
Los animales fueron videograbados para poder comprobar que el animal efectivamente interactuara con el estímulo presentado ya sea aserrín limpio o aserrín de machos. El estímulo fue presentado por 90 minutos. El video fue capturado desde una vista lateral, con una ligera inclinación hacia arriba con una cámara web (Logitech C170). La inclinación superior fue suficiente para poder observar el desplazamiento del animal en la profundidad de la caja. El video fue transformado a cuadros, editado y cortado (a la sección de la primera media hora) con el programa Adobe Premiere CC 2017, además de una edición en el color, seleccionando los parámetros adecuados de contraste, forma, intensidad, saturación, etc., adecuados a cada video. La edición se hizo de manera individual en cada video, para poder obtener un contraste adecuado entre el ratón y el fondo. Se eliminaron los cuadros iniciales, ya que solo se consideraron los

cuadros posteriores a la colocación del estímulo, posteriormente los finales, de modo que el número de cuadros fuera equivalente a 30 minutos, considerando la velocidad de captura en cuadros por segundo (por sus siglas en inglés, FPS), descartando los demás. En este momento, la secuencia de imágenes está lista para comenzar el análisis de trayectoria del ratón en la caja; para esto se utiliza el *plug-in Animal Tracker* (Gúlyas *et al.*, 2016) para Fiji (NIH). En este *plug-in*, se seleccionó un área de interés (Fig. 9) correspondiente a la de la ubicación del estímulo y un área total a rastrear; se ajustó un umbral (Fig. 9) que le permitió al programa seguir al animal por diferencia de contraste. Se hicieron ajustes con las diferentes herramientas del apartado *Post-processing* del *plug-in*, eliminando marcas de fondo con el fin de que el fondo quedara en negro y la figura del ratón en blanco, esto es particular y diferente en cada video. Una vez terminado el ajuste, se usó la opción *Show blobs*, para indicarle al programa el objeto a rastrear. Al finalizar el análisis, se verificó manualmente que el programa hubiera completado el seguimiento de la trayectoria del ratón en la totalidad de la secuencia de imágenes, de lo contrario se editaba el seguimiento de la trayectoria con la herramienta *Tracking Editor* para poder hacer una interpolación del rastreo que el programa hace automáticamente y en línea recta tras haber seleccionado los dos puntos donde se perdió el rastreo.

Finalmente, en otra opción del *plug-in* se utilizó la herramienta *Tracking Analyzer* para poder cargar los archivos dados por el programa; se ajustan los valores de FPS y se configuraron los parámetros para que el programa diera resultados en sumatoria y por área. Finalmente, para evaluar la permanencia en el sitio, se tomaron en cuenta el valor total del tiempo en el área de interés, y para la exploración activa se resta el tiempo inmóvil.

#### *Análisis estadístico*

Se usaron las siguientes pruebas: para la comparación de los pesos y edades de los grupos de IP y MS, se usó la prueba no paramétrica de U Mann Whitney. Para la comparación del *Prl* y *Prlr-l* se usaron las pruebas de Kruskal Wallis y post-hoc Dunn's para datos no paramétricos. La comparación de la relación del ligando-receptor se hizo con una correlación de Spearman. Tanto los datos de conducta exploratoria, como los de conteo celular se analizaron mediante la prueba paramétrica ANOVA de dos vías (factor 1; factor 2); la prueba post-hoc utilizada fue Bonferroni y Tukey respectivamente. Todos los datos se analizaron con el programa estadístico GraphPad Prism 8, tomando el valor  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo. Además de que se hicieron distinciones de los valores de  $p$  con  $*$  =  $p > 0.05$ ,  $**$  =  $p > 0.01$ ,  $***$  =  $p > 0.001$ ,  $****$  =  $p > 0.0001$ . Los datos se analizaron de acuerdo a su distribución. La prueba de normalidad utilizada en todos los datos fue Shapiro-Wilk ( $p > 0.05$ ).



**Fig 9. Procesamiento de imagen para rastreo de la trayectoria del sujeto..** Usando la herramienta de *zone designer* del *plug-in Animal Tracker*, se seleccionó el área total de la caja y dentro de este el cuadrante que abarca aproximadamente la tercera parte del área total de la caja, donde se colocó el estímulo (a). Delimitación de área de estímulo para rastrear (b) Imagen representativa del ajuste del umbral para el rastreo de la trayectoria del ratón. (c) Imagen representativa del seguimiento de la trayectoria (línea amarilla).

## RESULTADOS

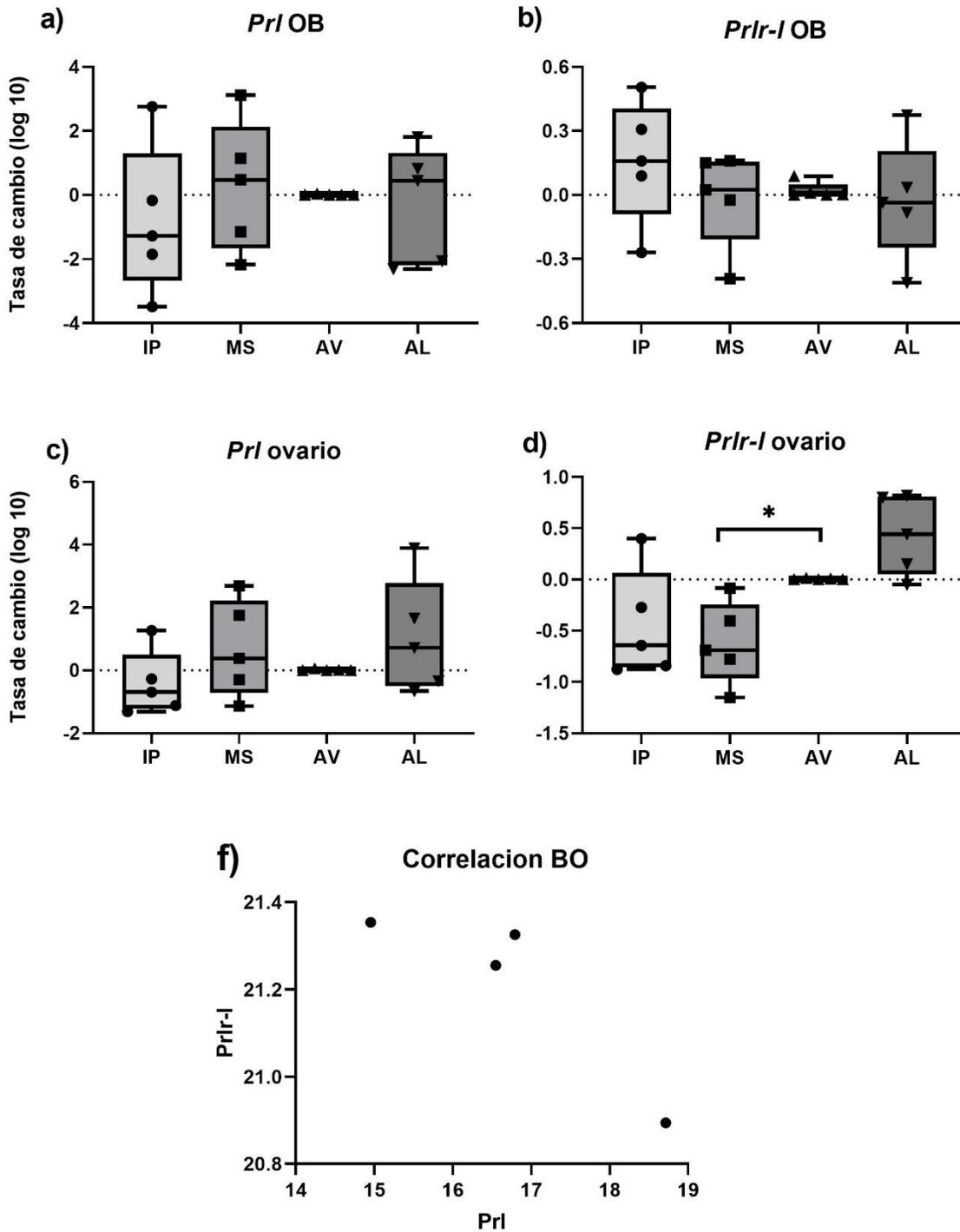
### *Cuantificación del ARNm de Prl y Prlr-1 en el BO.*

Se corroboró que todos los ratones del grupo de IP y MS fueran homogéneos y mutuamente excluyentes en edad y peso (Anexo 1, Fig. A). Posteriormente se analizaron 5 *pools* por grupo; conformados de la siguiente manera: tres animales por *pool* para los grupos de IP y MS, mientras en los grupos de AV y AL, dos animales para cada *pool*. Los datos fueron convertidos a su valor log (10) debido a la dispersión que presentaban y para facilitar su manejo; se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis, debido a lo obtenido por la prueba de normalidad Shapiro Wilk previamente realizada (Anexo 2, tabla 1).

En las comparaciones que se hicieron de *Prl* y el *Prlr-1* en el BO, la prueba utilizada no arrojó diferencias estadísticamente significativas [ $H=1.606$ ,  $p=0.6581$ ;  $H=2.897$ ,  $p=0.4078$ ] (Anexo 3, tabla 1) (Fig. 10a, b) entre los diferentes grupos, indicando que la expresión tanto de la hormona como del receptor son constantes y no presentan cambios que dependan del curso de las

diferentes etapas de maduración sexual de las hembras en los grupos analizados. Además de esta estructura, se analizó la expresión presente en el ovario, ya que esta glándula está directamente relacionada con los cambios asociados a la maduración sexual en cada edad y muestra una alta expresión de *Prl* y *Prlr-l*. En el ovario no se observaron diferencias significativas en la expresión de la hormona ([H=3.389, p=0.3355] (Anexo 3, tabla 1) (Fig. 10c), pero sí se encontraron diferencias en el receptor [H=11.78, p=0.0082] (Anexo 3, tabla 1) (Fig. 10d) en el grupo de MS comparado con el grupo AL de acuerdo a la prueba post hoc de Dunn's (p=0.0139), llegando el primero a alcanzar valores hasta diez veces menores que el segundo.

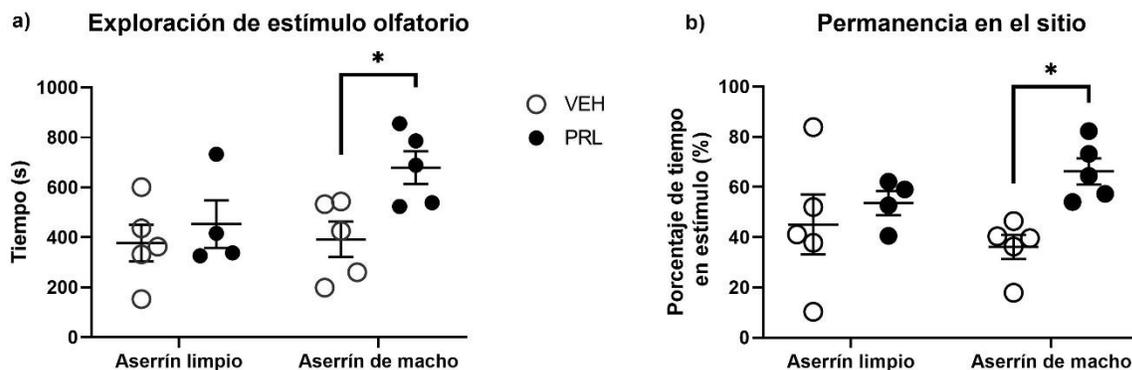
Posteriormente y con la intención de observar la relación del ligando y el receptor en cada estructura se hizo una correlación de Spearman, sin embargo, no se encontró correlación entre el ligando y el receptor del BO (Fig. 10e, f) [OB: R=-0.8, p=0.333] (Anexo 3, tabla 2).



**Figura 10. Tasa de cambio de la expresión del ARNm de *Prl* y *Prlr-I*.** A) Tasa de cambio de la expresión de *Prl* en el BO ( $p > 0.05$ ). B) Tasa de cambio en la expresión de *Prlr-I* en el BO ( $p > 0.05$ ). C) Tasa de cambio de la expresión de *Prl* en el ovario ( $p > 0.05$ ). D) Tasa de cambio de la expresión de *Prlr-I* en el ovario, donde se observa una menor expresión en el grupo MS comparado con el grupo AL ( $*p < 0.05$ ). E) Análisis de correlación de ligando y receptor en OB  $R = -0.8$  ( $p > 0.05$ ).  $n = 5$ , IP: Inicio de Pubertad, MS: Madurez sexual, AV: Adultas Vírgenes y AL: Adultas Lactantes. Los grupos de IP y MS están representados cada pool con tres animales cada uno, mientras que en los grupos de AV y AL están representados cada pool con dos animales. La tasa de cambio se calculó con respecto al grupo AV y se muestran en escala log (10).

### Permanencia y exploración del sitio de estímulo

Se analizó la distribución de los datos con la prueba de normalidad de Shapiro Wilk, y de acuerdo con el resultado (Anexo 2, tabla 2) se procedió a analizar con una ANOVA de dos vías, definiendo como factores el tratamiento (vehículo o PRL) y la condición a la que el animal estuvo expuesto durante el experimento (aserrín limpio o aserrín de machos/sucio), además de evaluarse la interacción entre las variables. Se analizó el tiempo en el que el animal hizo una exploración activa y por otro lado el porcentaje de tiempo que permaneció en el sitio, independientemente de que estuviera o no inmóvil. La prueba arrojó diferencias significativas para el tratamiento tanto para la exploración activa [ $F_{\text{Interacción}} (1, 15)=1.943$ ,  $p=0.1837$ ;  $F_{\text{Condición}} (1,15)= 2.45$   $p=0.1314$  ;  $F_{\text{Tratamiento}} (1,15)= 5.3794$ ,  $p=0.0294$ ] (Anexo 3, tabla 3) como para la permanencia en el sitio [ $F_{\text{Interacción}} (1, 15)=1.1791$ ,  $p=0.1791$ ;  $F_{\text{Condición}} (1,15)= 0.05964$ ,  $p=0.8104$ ;  $F_{\text{Tratamiento}} (1,15)= 6.427$ ,  $p=0.0229$ ] (Anexo 3, tabla 3). No parece haber efecto en la interacción entre las variables. Utilizando la prueba post hoc Bonferroni, en ambos parámetros analizados se observaron diferencias en el tratamiento dentro de la condición de aserrín de machos ( $p=0.0286$ ;  $p=0.0231$ , exploración y permanencia respectivamente). El tratamiento con PRL produce una conducta exploratoria y una preferencia por un periodo de tiempo significativamente más prolongado que el vehículo en los animales que fueron sometidos al estímulo olfatorio de aserrín de machos (Fig. 11).



**Fig. 11. Exploración activa y permanencia en el sitio de estímulo.** A) Exploración activa del estímulo olfatorio presentado. En la exploración activa se encontraron diferencias entre el vehículo (VEH) y el tratado con PRL en la condición de aserrín de macho ( $p<0.05$ ). B) Permanencia en el sitio. Sin considerar la actividad motora del animal, los animales tratados con PRL permanecen un mayor porcentaje del tiempo total en el aserrín de macho comparado contra el vehículo ( $p<0.05$ ). Datos mostrados como media  $\pm$  SEM.  $n = 5$ , excepto en aserrín limpio tratado con PRL, donde  $n = 4$ .

### *Conteo de células positivas para c-Fos*

Los grupos de conteo celular se dividieron en tres grupos: los que no tuvieron ninguna exposición, los que se expusieron a caja limpia y los que se expusieron a caja sucia (con aserrín de machos expertos). La cuantificación se realizó en la totalidad de la CM y CG, y en las porciones anterior y posterior.

Debido al diseño del experimento se optó por utilizar una ANOVA de dos vías, ya que es el análisis estadístico que más se ajusta al diseño experimental. Este análisis permitió evaluar la relación entre las variables y dentro de ellas. En este caso, se organizaron las variables de la misma manera que en el resultado anterior (Interacción: entre las dos variables evaluadas; condición: exposición o caja; tratamiento: vehículo o PRL).

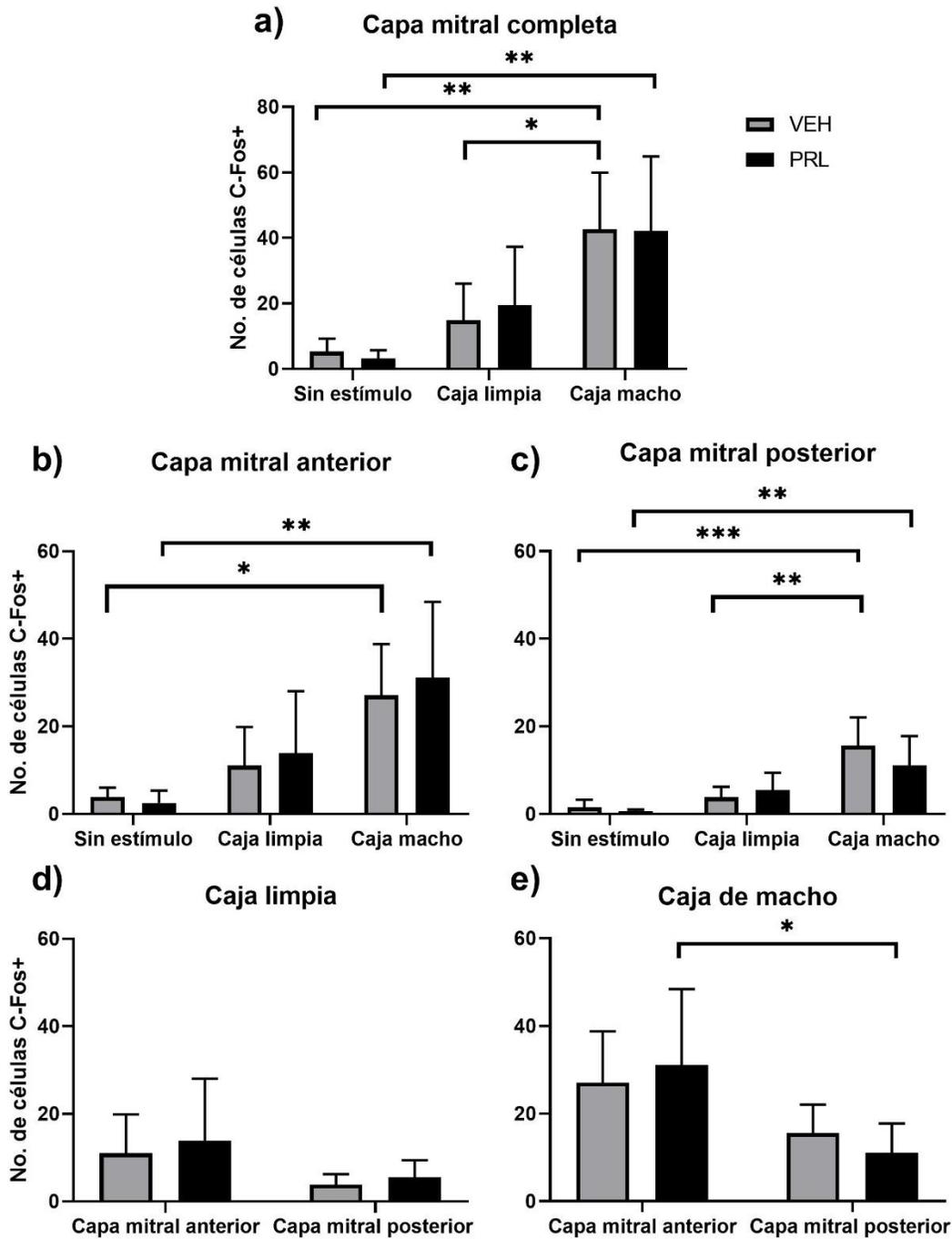
En el análisis de capas completas (Fig. 12a), para la CM se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas de los animales en términos de condición [ $F_{\text{Interacción}} (2, 22) = 0.1365$   $p=0.8732$ ;  $F_{\text{Tratamiento}} (1, 22) = 0.01315$   $p=0.9097$ ;  $F_{\text{Condición}} (2, 22) = 15.40$   $p<0.0001$ , (Anexo 3, tabla 4). En el tratamiento con PRL, caja sucia, mostró diferencias comparando contra el grupo sin estímulo ( $p=0.0012$ ) y para los animales tratados con vehículo, la condición de caja sucia tuvo diferencias estadísticamente significativas con la caja limpia ( $p=0.0303$ ) y la condición de no estímulo ( $p=0.0051$ ).

En la CG completa (Fig. 13a) no hay distinciones en la respuesta de activación celular comparando entre caja limpia y caja sucia, ni efecto por la interacción entre ambas variables [ $F_{\text{Interacción}} (2, 22) = 0.3547$ ,  $p=0.7053$ ;  $F_{\text{Tratamiento}} (1, 22) = 0.7257$   $p=0.4035$ ;  $F_{\text{Condición}} (2, 22) = 8.468$   $p=0.0019$ ] (Anexo 3, Tabla 4). En el vehículo los animales tuvieron diferencia estadísticamente significativa solo en las condiciones de no estímulo comparado con caja de macho ( $p=0.0276$ ), mientras que los tratados con PRL fueron diferentes en la condición de no estímulo comparado con caja de macho ( $p=0.0230$ ). No se encontraron diferencias entre caja limpia y aserrín de macho, ni diferencias entre los tratamientos dentro de las condiciones.

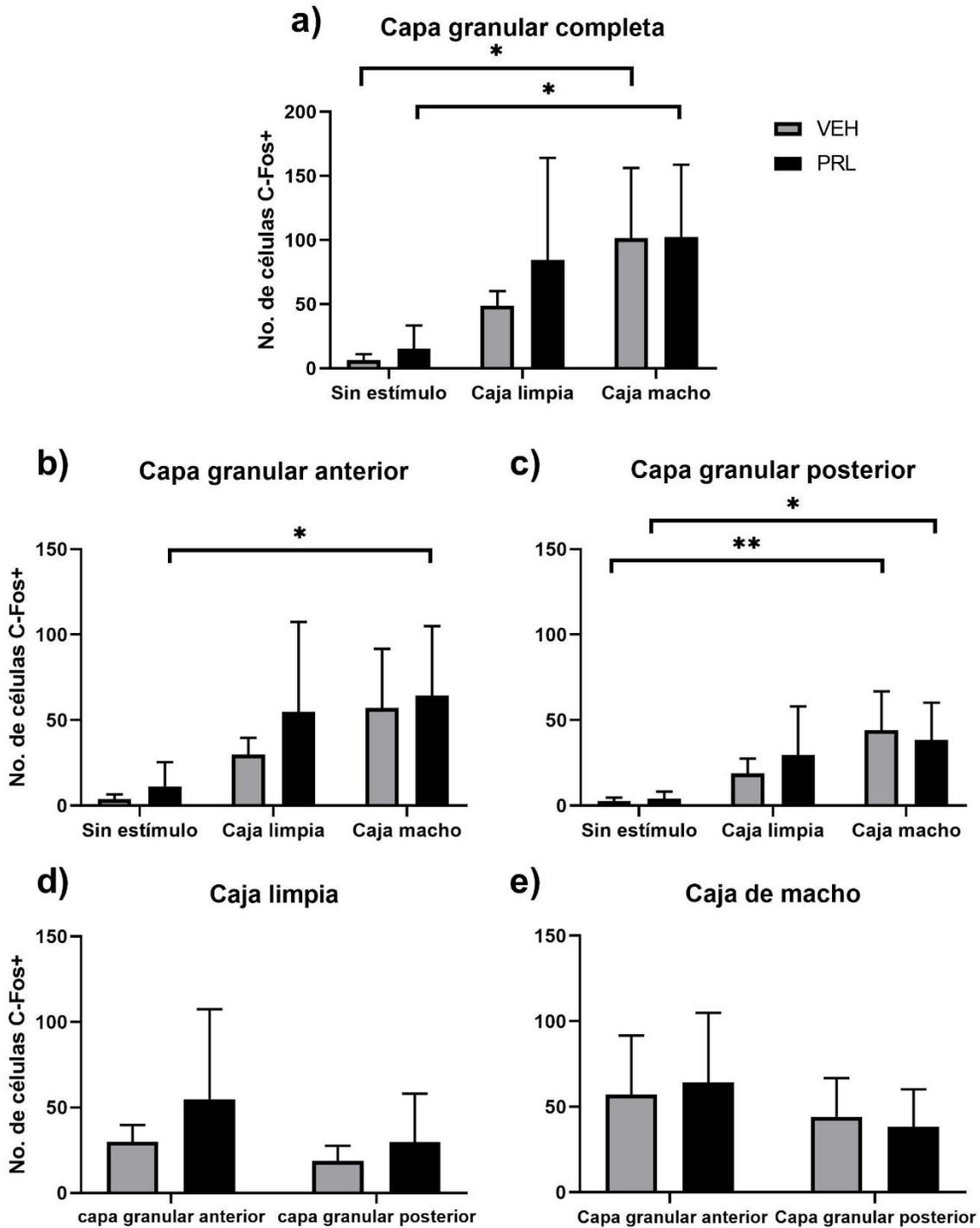
Además debido a la división anatómico-funcional del BOA (Kumar *et al.*, 1999; Larriva-Sahd, 2008; McGregor *et al.*, 2004), se analizó el patrón de respuesta de las porciones anterior y porciones posterior de cada capa celular ante las diferentes condiciones. En la CM anterior (Fig. 12b), las variaciones se vieron entre las condiciones y no entre los tratamientos, o la interacción de ambos ([ $F_{\text{Interacción}} (2, 22) = 0.1419$   $p=0.8685$ ;  $F_{\text{Tratamiento}} (1, 22) = 0.1976$ ,  $p=0.6610$ ;  $F_{\text{Condición}} (2, 22) = 12.22$ ,  $p=0.0003$ ] (Anexo 3, Tabla 4), tanto vehículo y tratamiento con PRL son distintos en la condición no estímulo contra caja con aserrín de macho ( $p=0.0229$ ,  $p=0.0017$ ). En la capa posterior (Fig. 12c) también se encontraron diferencias únicamente entre condiciones [ $F_{\text{Interacción}} (2, 22) = 1.234$ ,  $p=0.3106$ ;  $F_{\text{Tratamiento}} (1, 22) = 0.5911$ ,  $p=0.4502$ ;  $F_{\text{Condición}} (2, 22) = 19.44$ ,  $P<0.0001$ ] (Anexo 3,

tabla 4). El vehículo tuvo diferencias en los animales sin estímulo contra los de caja de aserrín de machos ( $p= 0.0003$ ), y los de caja limpia contra los de aserrín de macho ( $p= 0.0013$ ). Los animales tratados con PRL mostraron un efecto estadísticamente diferente en las condiciones de no estímulo contra caja sucia ( $p=0.0023$ ). La CG anterior (Fig. 13b) muestra solo diferencias el grupo tratado con PRL entre las condiciones [ $F_{\text{Interacción}} (2, 22)=0.2430, p=0.7864$ ;  $F_{\text{Tratamiento}} (1, 22) = 1.170, p=0.2910$ ;  $F_{\text{Condición}} (2, 22) = 6.404, p=0.0064$ ] (Anexo 3, tabla 4). comparando el grupo de caja sucia contra el que no estuvo expuesto a estímulo ( $p=0.0452$ ). La porción posterior (Fig. 13c) tuvo diferencias en los tratamientos de vehículo ( $p=0.0093$ ) y PRL ( $p=0.0167$ ) comparando caja sucia contra no estímulo; no se observaron diferencias entre tratamientos dentro de las condiciones, ni en la interacción de ambas variables [ $F_{\text{Interacción}} (2, 22)=0.5207, p=0.6012$ ;  $F_{\text{Tratamiento}} (1, 22) = 0.09708, p=0.7583$ ;  $F_{\text{Condición}} (2, 22) = 9.950 p=0.0008$ ] (Anexo 3, tabla 4).

Se hizo adicionalmente una ANOVA de dos vías para comparar la actividad entre las porciones anterior y posterior de la CM en las cajas de estímulo. Lo encontrado en la actividad de la comparación de ambas porciones en la caja limpia nos hablaría de la activación basal ante la administración del tratamiento. En la caja limpia no se encontraron diferencias comparando las dos porciones [ $F_{\text{Interacción}} (1, 16)=0.02680, p=0.8720$ ;  $F_{\text{Tratamiento}} (1, 16) = 0.3535, p=0.5605$ ;  $F_{\text{Porción}} (1, 16) = 4.100, p=0.0599$ ] (Fig. 12d). Mientras que cuando se compararon las porciones de la CM en la caja sucia sí se mostró una respuesta diferencial entre las porciones o regiones del BOA [ $F_{\text{Interacción}} (1, 14)=0.5960, p=0.4530$ ;  $F_{\text{Tratamiento}} (1, 14) = 0.001769, p=0.9670$ ;  $F_{\text{Porción}} (1, 14) = 8.092, p=0.0130$ ], los animales tratados con PRL mostraron una activación mayor en la porción anterior comparada con la porción posterior ( $p=0.0334$ ) (Fig. 12e). Estos efectos no fueron vistos en la CG al comparar las porciones en caja limpia (Fig.13d) [ $F_{\text{Interacción}} (1, 16)=0.2617, p=0.6159$ ;  $F_{\text{Tratamiento}} (1, 16) = 1.705, p=0.2101$ ;  $F_{\text{Porción}} (1, 16) = 1.756, p=0.2037$ ] y caja sucia (Fig. 13e) [ $F_{\text{Interacción}} (1,14)=0.1925, p=0.6676$ ;  $F_{\text{Tratamiento}} (1, 14) = 0.001599, p=0.9687$ ;  $F_{\text{Porción}} (1, 14) = 1.750, p=0.2071$ ]. La PRL está promoviendo una activación diferencial (mayor) en la CM anterior de los animales analizados.



**Figura 12. Análisis de células inmunorreactivas para c-Fos en la capa mitral.** A) Conteo de células positivas a c-Fos de la capa mitral (total) donde se observan diferencias del aserrín sucio (de machos) comparado con los controles sin estímulo  $p < 0.05$ . No hubo diferencias entre tratamientos por condición. Se muestra diferencias entre caja sucia y caja limpia solo para el tratamiento con vehículo  $p < 0.05$ . B) Conteo de células positivas a c-Fos de la capa mitral anterior, donde existen diferencias significativas entre los animales que estuvieron en la caja con el aserrín sucio y los animales que no fueron expuestos a ningún estímulo  $p < 0.05$ . C) Conteo de células positivas para c-Fos en la capa mitral posterior. Hay diferencias entre los animales de caja sucia contra los animales que no fueron expuestos a estímulos. Además de una diferencia que se presentó entre la caja sucia y la caja limpia en los animales tratados con vehículo  $p < 0.05$ . D) Comparación de las dos regiones de la capa mitral en la condición de caja limpia, donde no se observaron diferencias en la activación celular en ambas porciones. E) Comparación de la región anterior y posterior en los animales que fueron estimulados con las cajas sucias. Se observó un cambio que fue estadísticamente significativo en los animales tratados con PRL, presentando una mayor activación en la parte anterior, comparado con la posterior.  $n = 5$  en cada condición excepto vehículo caja sucia donde  $n = 4$ .



**Figura 13. Análisis de células inmunorreactivas para c-Fos en la capa granular.** A) Conteo de células positivas para c-Fos en la capa granular total. Activación mayor en animales estimulados con caja de aserrín de machos, comparado con el control sin estímulo  $p < 0.05$  (ambos tratamientos) B) Región anterior, se observaron diferencias estadísticamente significativas en los animales tratados con PRL comparando la caja sucia contra animales sin estímulo  $p < 0.05$ . C) Región posterior. Se encontraron diferencias en la activación de los animales expuestos a caja sucia comparados con los que no tuvieron exposición  $p < 0.05$ . D) No hubo efecto en las porciones anterior y posterior en la caja limpia  $p > 0.05$ . E) No hubo efecto en las porciones anterior y posterior al ser comparadas en los animales expuestos a las cajas sucias  $p > 0.05$ .  $n = 5$ , excepto en caja sucia y vehículo, donde  $n = 4$ .

## DISCUSIÓN

### ***El BO mantiene una expresión celular constante de *Prl* y *Prlr-I* durante la maduración sexual***

Existen pocas evidencias de la expresión de los PRLR en el BO. Algunas demuestran una relación de la hormona con la alteración de procesos neuroendocrinos asociados con la reproducción que son mediados por el olfato. Sin embargo, no se conoce el mecanismo exacto de estas a nivel del BO. Uno de los objetivos del presente trabajo fue caracterizar la expresión del receptor *Prlr-I* en el BO durante los momentos clave de la maduración sexual en las hembras, edades en las que comienzan a adentrarse a la etapa reproductiva, cuando se es plenamente madura para la reproducción y cuando finalmente se ha llevado a cabo.

De acuerdo con las evidencias, sabemos que las hembras tienen mayor concentración de PRL en suero durante la lactancia (Brown, Herbison, & Grattan, 2014); los *Prlr* cambian sus niveles de expresión de acuerdo a la fase del ciclo estral en ratas y en diferentes órganos (Nagano & Kelly, 1994), y que hay expresión de los *Prlr* (en el BO y en diferentes órganos) en etapas embrionarias (Freemark *et al.*, 1996, 1997). De modo que en el presente trabajo, al no haber datos previos donde se explorara la expresión de *Prl* y *Prlr-I* en el BO, se esperaba ver algún patrón que respondiera a los estadios fisiológicos de cada etapa reproductiva, o ver cambios en la expresión del ARNm de *Prl* y *Prlr-I* en el BO así como en el control positivo (ovario). Sin embargo, los niveles de expresión de *Prl* y *Prlr-I* no cambiaron en ninguna de las condiciones estudiadas.

Los niveles de PRL en suero varían en el ratón hembra de acuerdo a la etapa reproductiva en que se encuentran. En el periodo de pubertad los niveles rondan los 30-40 ng/mL (Michael, Kaplan, & Macmillan, 1980); en una hembra que ya es sexualmente madura aumenta en el periodo del estro, teniendo niveles entre los 50-100 ng/mL (Michael, 1976; Sinha, Salocks, & Vanderlaan, 1975); y en la lactancia llega hasta 200-280 ng/mL (Brown *et al.*, 2014). Sin embargo, se desconocen los niveles de PRL en hembras durante la etapa de maduración sexual. De acuerdo a los resultados obtenidos, la expresión de los ARNm de *Prl* y de *Prlr-I* en el BO no sigue los patrones de los niveles de PRL en suero; contrario al caso de lo observado en el ovario. Los niveles de expresión de *Prlr-I* en el ovario aumentan en las hembras adultas, que ya son maduras sexualmente (AV) y esto parece mantenerse en la siguiente etapa (AL). La expresión de *Prl* en el ovario es alta en periodos juveniles y disminuye cuando ocurre la primera ovulación sugiriendo que después de este periodo, esta expresión se mantiene estable (Imaoka *et al.*, 1998); esta evidencia coincide con lo encontrado en este trabajo ya que no observamos diferencias significativas en los niveles de expresión de *Prl* en los periodos evaluados. Por otro lado, no se

observó una relación entre ligando y receptor en BO que nos permitiera comenzar a entender la dinámica de comunicación celular a nivel local mediada por PRL en estas etapas, a este nivel anatómico.

En ratones hembra lactantes existe un aumento en la expresión de los *Prlr* en el BO con respecto a hembras conspecíficas de la misma edad sin experiencia sexual (Canavan, Mayes, & Treloar, 2011). Esta expresión incrementada se observa en particular en el BOA. Así mismo, los *Prlr* muestran una tendencia a disminuir su expresión conforme se avanza en los días de la lactancia (día cero, uno y dos post-parto) en el BOP, la cual coincide con el decremento de los niveles de PRL en suero de las mismas hembras (Amenomori *et al.*, 1969; Canavan, Mayes, & Treloar, 2011). La expresión de los *Prlr* en el BO de las hembras de ratas lactantes está regulado a la alta por mecanismos epigenéticos (acetilación de la histona H4) promovidos por la conducta materna, ya que las hembras que tienden a lamer más a sus crías tienen mayor expresión del receptor que las hembras que presentan un decremento en esta conducta (de Moura *et al.*, 2016, 2015). Estas dos evidencias nos dicen que la ausencia del aumento en la expresión del *Prlr-l* en el BO en las lactantes que se esperaba pudo haberse visto afectado por alguna de estas dos situaciones, ya los animales lactantes se sacrificaron en el día tres de la lactancia, el cual se determinó respecto a los niveles en suero (Anderson, S. M. *et al.*, 2014), podría haber influido que ya hubiera disminuido la expresión del BOP. Esto pudo intervenir en el momento de hacer la detección de la expresión, ya que se evaluó el BO total. Sin mencionar que los patrones de conducta materna no fueron evaluados.

La expresión de *Prl* así como del *Prlr-l* en el BO fue constante, ya que no se observaron cambios mediados por efecto de la edad ni por alguno de los estadios reproductivos evaluados. Podríamos sugerir, además, que los niveles de *Prl* y *Prlr-l* no están siendo influenciados a nivel local por las concentraciones séricas de PRL. Estos resultados nos permitieron cuestionarnos si a nivel de activación celular habría un efecto particular mediado por PRL, así que se hizo una evaluación de la activación de las células del BO por PRL ante un estímulo sexualmente relevante únicamente en la edad adulta. Aprovechando la evidencia existente en la relación que hay entre el sistema vomeronasal, la reproducción y la influencia de la PRL (mencionada detalladamente en los antecedentes de este proyecto), se diseñó un experimento en el cual las hembras recibieron la administración aguda de PRL y se expusieron a un estímulo olfatorio con relevancia sexual.

### ***La PRL interfiere con la respuesta celular normal de la capa mitral ante un estímulo olfatorio sexualmente relevante y promueve la activación de la región anterior del BOA***

Cuando una hembra está expuesta al aserrín donde un macho ha habitado, se activan una serie de respuestas fisiológicas y conductuales que ya han sido descritas y revisadas, entre estas podemos destacar una activación mayor (expresión de c-Fos) de la porción anterior del BOA, y una actividad principal de las CM, siendo esta respuesta específica al sexo (Guo, Zhou, & Moss, 1997; Inamura, Kashiwayanagi, & Kurihara, 1999; Kimoto & Touhara, 2005; Norlin, Gussing, & Berghard, 2003). Esta respuesta puede verse afectada por la experiencia sexual, las hembras sin experiencia tienen una mayor activación de la CM que las que ya han tenido experiencia sexual (Marco-Manclus *et al.*, 2020).

Interesantemente, en este trabajo encontramos una activación diferencial entre la región anterior comparada con la posterior en la CM del BOA en los ratones tratados con PRL. En este protocolo el vehículo no replicó la respuesta descrita en el párrafo anterior. Sin embargo, es importante mencionar que la activación celular puede estar influenciada por fibras centrifugas. Como se mencionó en la introducción de esta tesis, existen fibras centrifugas que conectan varias regiones centrales con el BOA de manera recíproca (Martínez-Marcos & Halpern, 1999). Uno de los núcleos centrales involucrados en estas conexiones recíprocas con la región anterior del BOA es la MePD, que está enviando a esta región proyecciones de células kisspeptinérgicas, ejerciendo un efecto inhibitorio en la CM mediado por la CG (Pineda *et al.*, 2017). Además se ha descrito que la kisspeptina está fuertemente implicada en el control de la conducta sexual mediada por el olfato, por las conexiones que también tiene con varias regiones del hipotálamo (Hellier *et al.*, 2018). Existen regiones que participan en la vía olfatoria accesoria donde se ha reportado la expresión de PRLR, entre ellas la MeA y el núcleo ventrolateral del hipotálamo ventromedial (VMHvl), las cuales son también núcleos kisspeptinérgicos (Hellier *et al.*, 2018; Kokay *et al.*, 2018; Pineda *et al.*, 2017), de modo que no podemos descartar que exista una participación a nivel central de estas regiones kisspeptinérgicas debido a la respuesta que tengan a PRL.

Algo todavía más interesante es el efecto que se observó en la exploración del estímulo olfatorio (aserrín de machos), donde se vio que los ratones tratados con PRL tuvieron una mayor exploración y permanencia del estímulo, lo cual podría indicarnos que la respuesta conductual puede estar asociada a esta activación diferencial de la región anterior de la CM en el BOA. Más adelante se discutirá la relevancia de llevar a cabo un análisis de las estructuras centrales involucradas para poder explicar a fondo cuál es el papel de la PRL en esta vía olfatoria y en la respuesta que induce.

De acuerdo con la evidencia, la hipótesis particular en este experimento es que en los animales tratados con PRL se observaría un efecto potenciador de la activación celular entre los estímulos de caja limpia contra los que fueron expuestos al aserrín de machos. Las diferencias observadas en el vehículo, no se presentaron en los animales tratados con PRL en el análisis total de la CM y la parte posterior de esta capa. Indicando que la PRL está haciendo que se pierdan los cambios entre el aserrín limpio y de macho (que se vieron en el vehículo). El tratamiento agudo de PRL mostró un incremento en la activación celular en la CM no lo suficientemente mayor como para que la activación fuera distinta al vehículo en la misma condición (caja limpia), pero sí lo suficiente como para evitar que se replicara la respuesta diferencias esperadas. Interesantemente, en otro resultado del laboratorio (Corona *et al.*, en preparación), se observó, en registros electrofisiológicos de campo *in vitro*, que la administración de PRL incrementa la actividad basal en la CM de la región posterior del BOA, efecto que no se observa en animales que fueron expuestos a un tratamiento crónico de PRL previo al registro. De modo que este cambio en la respuesta del tratamiento agudo de PRL podría estar estimulando a la CM de esta región y de ese modo, inhibir la respuesta diferencial ante las condiciones. Los resultados del presente trabajo sugieren que la administración aguda de PRL a nivel sistémico es suficiente para replicar el efecto que se observa en la actividad eléctrica poblacional de las CM en un registro de campo (Corona *et al.*, en preparación).

En la región anterior de la CG del BOA también se observó un efecto entre animales no tratados comparado con animales expuestos al aserrín de machos, teniendo una mayor activación en la CG de los ratones que fueron expuestos al aserrín de macho. Sin embargo, no se observaron diferencias entre los animales expuestos al aserrín limpio comparados con los expuestos al aserrín de los machos. Esto coincide con resultados obtenidos en el laboratorio, en donde animales tratados en el periodo juvenil con PRL no muestran diferencias en la activación de la CG (a nivel total) al ser expuestas al aserrín de macho comparado con a aserrín limpio (Corona *et al.*, 2020). La diferencia que se observó en la activación celular en el presente proyecto fue con el grupo de hembras que no fueron tratadas, es decir con un control adicional que no fue utilizado en el trabajo de Corona y cols. (sometido a revisión), de modo que el efecto podría atribuirse a una semejanza entre el tratamiento crónico y el tratamiento agudo de PRL o a la ausencia del control sin estímulo donde se observó la activación diferencial. Las diferencias metodológicas entre ambos experimentos dificultan analizar con mayor profundidad la inhibición de esta respuesta.

El tratamiento agudo de PRL promovió una activación diferencial en la CM ante el estímulo sexualmente relevante, en particular, en la región anterior comparada con la región posterior del BOA. Este efecto no fue observado en la CG. Se puede concluir hasta ahora que el tratamiento

con PRL inhibe la activación diferencial de la CM total cuando los ratones son expuestos al aserrín de los machos comparado con la exposición al aserrín limpio. Así mismo, la ausencia de activación diferencial en la CG nos indica que este grupo de interneuronas no parece estar participando en la inhibición de las CM por efecto de la PRL.

La respuesta diferencial de la CM y CG ante el estímulo de la caja con aserrín de macho contra la caja del aserrín limpio puede variar dependiendo las condiciones hormonales de las hembras. Marco-Manclus, y cols., (2020) recientemente demostró que la activación diferencial de las CM y CG ante estímulos sexuales puede alterarse por condiciones como el reemplazo hormonal o el hecho de que el estímulo esté compuesto por aserrín de varios machos, como fue el caso en el presente trabajo, en donde se usó como estímulo la mezcla de aserrín de dos machos expertos.

### ***La administración de PRL promueve la exploración y permanencia en un estímulo olfatorio sexual***

Como se explicó a detalle en la metodología de esta tesis, se verificó que los animales interactuaron con el estímulo que se les presentó. Interesantemente los resultados respecto a la activación diferencial que se observaron en la región anterior del BOA (encargada de la percepción de olores sociales) coinciden con los resultados obtenidos en la exploración del estímulo olfatorio, en donde las hembras tratadas con PRL no solo pasaron más tiempo explorando este estímulo si no que también permanecieron más tiempo en este sitio independientemente de su actividad. La PRL podría estar participando en promover una conducta social mediada por la comunicación del BOA con estructuras centrales. En cuanto a esto, trabajos como el de Donhoffner *et al.*, en 2017, han demostrado que la PRL favorece el reconocimiento y aprendizaje social en ratas macho.

El efecto observado en el presente estudio podría indicar un cambio conductual asociado con la actividad de las células de la CM de la región anterior del BOA e incluso con los núcleos centrales con los que esta conectado, como son la MeA, BNSTp, el BAOT y el PMCo (Mohedano-Moriano *et al.*, 2007; Hashikawa *et al.*, 2016). La actividad de la MeA o su influencia tanto en la activación como en el despliegue de la conducta está dada por su conexión con diferentes estructuras hipotálamicas relacionadas a la conducta sexual, VMHvl (Hashikawa *et al.*, 2016; Mohedano-Moriano *et al.*, 2007)

A este nivel es complejo determinar la ruta o mecanismo por el cual la PRL estaría ejerciendo su efecto, ya que la expresión genética observada fue a nivel total del BO. Existen diferentes estructuras centrales que forman parte del sistema olfatorio en las cuales recientemente se han

encontrado también los PRLR, como el VMHvl, el MPN (núcleo preóptico medial), MeA y BNSTp (Kokay *et al.*, 2018). El BNST y el MeA, forman parte de las estructuras que envían fibras centrifugas de regreso al BOA y podrían interferir con la activación diferencial a través de su comunicación con las CG (Mohedano-Moriano *et al.*, 2007).

Los olores sexuales también tienen un componente motivacional y de recompensa. Dos vías de recompensa podrían estar implicadas, una de ellas inicia con la activación de la amígdala vomeronasal, la cual está conectada con la amígdala basolateral y con estructuras relacionadas con la recompensa en el estriado ventral, principalmente el tubérculo olfatorio, las islas de calleja y el núcleo accumbens, la cual se mantiene activa y es independiente a la vía clásica de recompensa, mediada por el área tegmental ventral (Lanuza *et al.*, 2008). Otra vía podría estar dada por el MPN, el cual tiene conexiones directas al área tegmental ventral y éste al núcleo accumbens. Además se agrega la evidencia de una vía motora directa desde el hipotálamo, ya que tanto el VMHvl y el MPN tienen conexiones con la sustancia gris periacueductal, el cual también tiene expresión de PRLR (Hashikawa *et al.*, 2016; Kokay *et al.*, 2018).

## **Conclusiones**

Los datos experimentales generados en esta tesis nos permiten concluir que el ARNm de *Prl* y del *Prlr-I* no varía durante la maduración sexual en el BO, si no que se mantiene constante. Por otro lado, en una hembra adulta la respuesta que puede tener la administración aguda de PRL muestra que a nivel de la CM (total y posterior) se interfiere la activación que promovería un estímulo olfatorio del sexo opuesto, esto podría deberse al efecto potenciador de la activación celular que tuvo la PRL observada en los animales expuestos al aserrín limpio. Sin embargo, esta misma capa mostró una activación diferencial entre la región anterior comparada con la posterior de las CM, región que también está implicada en la interpretación y respuesta ante ferómonas sexuales. Esto parece coincidir con la motivación o la exploración al estímulo que se observó en el experimento: la prolactina promueve la activación de la CM anterior y la exploración olfatoria en un estímulo sexual. Aún así, el efecto de PRL pudo haberse dado en varias regiones del cerebro que participan en la vía vomeronasal debido a que la vía de administración utilizada fue intraperitoneal.

## **Perspectivas**

Son necesarios experimentos posteriores donde se analice la participación individual de los núcleos centrales del hipotálamo y la amígdala que participan o que tienen relación con el sistema olfatorio. Además es necesario hacer evaluaciones a nivel de proteína de PRLR-L, ya que esto

nos permitiría evaluar de manera más certera si la PRL está ejerciendo un efecto funcional en el BO. Si bien, se ha reportado la dificultad de identificar los PRLRs en el SNC, existen otros métodos en los que se podría detectar la expresión de diferentes proteínas relacionadas a las vías de señalización activadas por PRL. Además, es pertinente analizar en estudios posteriores, los niveles de PRL en suero de los animales, ya que los datos se compararon con estudios que no están actualizados. Analizar la concentración en suero, tanto la expresión en BO de los mismos animales, nos podría brindar una información valiosa de la dinámica molecular que está siendo efectuada por la PRL en las diferentes etapas reproductivas de interés de este estudio.

Estos experimentos adicionales ayudarían a dilucidar el nivel o la ruta por la cual la PRL altera o en este caso potencia sus efectos en el cerebro cuando, la interpretación y conducta ante un estímulo sexualmente relevante, e incluso de los procesos neuroendocrinos sexuales mencionados en la introducción de esta tesis

## ANEXOS

### Anexo 1.

Corroboración de pesos y edades. Se usó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk que arrojó como resultado que los datos no presentaban una distribución normal (Edades:  $p=0.1487$  en IP,  $p=0.0070$  en MS; Pesos:  $p=0.9218$  en IP,  $p=0.0330$  en MS), posteriormente, ambos parámetros se evaluaron con una prueba no paramétrica de U Mann Whitney encontrando diferencias significativas en ambos caso (Pesos:  $U=9$ ,  $p=0.0040$ ; edades:  $U=0$ ,  $p<0.0001$ ) (Fig. A).

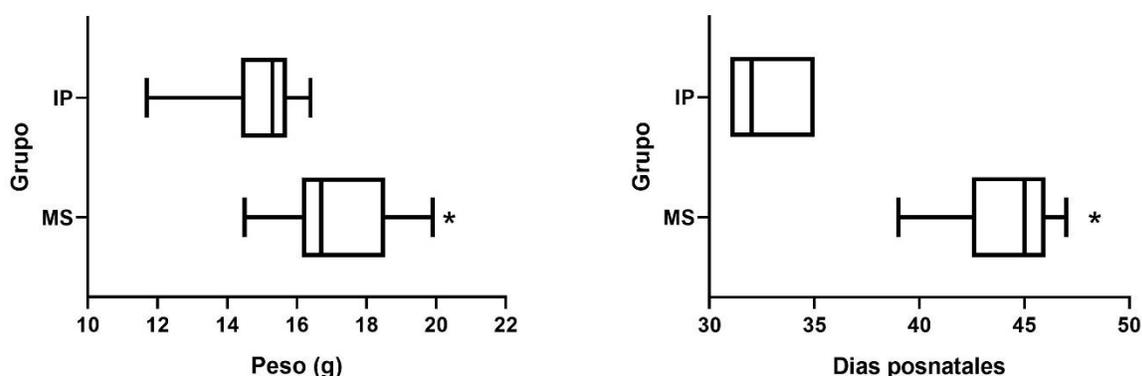


Figura A. Comparación de los pesos (Izquierda) y edades (Derecha) en los grupos de Inicio de Pubertad y Madurez Sexual. IP: Inicio de la Pubertad. MS: Madurez sexual. Los grupos son significativamente distintos en ambos parámetros ( $p<0.05$  en ambos casos de acuerdo con la prueba Mann-Whitney).  $n=9$ .

### Anexo 2.

Pruebas de normalidad.

Tabla 1. Valores de  $p$  en la prueba log-normal Shapiro Wilk para resultados de qPCR. IP=Inicio de pubertad, MS=Maduración Sexual, AV=Adulta lactante, AL=Adulta lactante.

Gen (Región)	IP	MS	AL	AV
<i>Prl</i> (BO)	0.8115	0.9362	0.0025	0.3064
<i>Prlr-I</i> (BO)	0.9042	0.1373	0.0015	0.8117
<i>Prl</i> (ov)	0.2711	0.8613	0.0071	0.5092
<i>Prlr-I</i> (ov)	0.2402	0.9769	0.1488	0.4323

Tabla 2. Valores de p en la prueba de normalidad de Shapiro Wilk (sin agrupar). VEH= Vehículo, PRL= Prolactina

Grupo	VEH caja limpia	VEH caja sucia	PRL caja limpia	PRL caja sucia
Valor p	0.9713	0.3201	0.0776	0.3323

### Anexo 3

Tabla 1. Media y error estándar de la media (SEM) para muestras de BO y ovario (tasa de cambio transformada a log10) usadas en la prueba de qPCR. Indique la n para cada variable analizada

ARNm	Grupo	Media; +/- SEM (OB)	Media; +/- SEM (ovario)
<i>Prl</i>	IP	-0.8044; 1.039	-0.422; 0.4603
	MS	0.2819; 0.9198	0.6817; 0.6901
	AV	0.009238; 0.007326	0.01496; 0.01135
	AL	-0.2589; 0.8189	1.058; 0.8195
<i>Prlr-1</i>	IP	0.1584; 0.1284	-0.4469; 0.2369
	MS	-0.01618; 0.1005	-0.6215; 0.1796
	AV	0.01971; 0.01692	0.004477; 0.002522
	AL	-0.02382; 0.1257	0.433; 0.1728

Tabla 2. Media y SEM de OB en el análisis de correlación.

ARNm	Grupo	Media; +/- SEM (OB)
<i>Prl</i>	IP	-0.422; 0.460
	MS	0.682; 0.690
	AV	0.015; 0.011
	AL	1.058; 0.820
<i>Prlr-l</i>	IP	-0.447; 0.237
	MS	-0.622; 0.180
	AV	0.004; 0.003
	AL	0.433; 0.173

Tabla 3. Media y SEM de la exploración y permanencia ante estímulo olfatorio.

Condición	Tratamiento	Media; +/- SEM (Exploración)	Media; +/- SEM (Permanencia)
Caja de aserrín limpio	Veh	377.073; 72.935	45.025; 11.909
	PRL	453.368; 95.183	53.624; 4.768
Caja de aserrín de machos	Veh	392.293; 70.255	36.121; 4.850
	PRL	678.485; 65.724	66.260; 5.199

Tabla 4. Media y SEM de conteo de células inmunorreactivas a c-Fos en el BOA.

Condición	Tratamiento	Media; +/- SEM (CM total)	Media; +/- SEM (CG total)	Media; +/- SEM (CM anterior)	Media; +/- SEM (CM posterior)	Media; +/- SEM (CG anterior)	Media; +/- SEM (CG posterior)
No estímulo	Veh	5.33; 1.934	6.417; 2.343	3.833; 1.101	1.5; 0.877	3.750; 1.397	2.667; 1
	PRL	3.133; 1.153	15.267; 8.111	2.533; 1.250	0.600; 0.194	11.200; 6.357	4.067; 1.845
Caja de aserrín limpio	Veh	14.800; 5.020	48.733; 5.187	11.00; 3.964	3.800; 1.088	29.933; 4.385	18.800; 3.895
	PRL	19.40; 7.998	84.467; 35.596	13.933; 6.311	5.467; 1.722	54.800; 23.520	29.667; 12.699
Caja de aserrín de machos	Veh	42.667; 8.616	101.417; 27.377	27.083; 5.851	15.583; 3.244	57.250; 17.209	44.167; 11.327
	PRL	42.200; 10.159	102.600; 25.089	31.133; 7.741	11.067; 2.999	64.333; 18.183	38.267; 9.791

## LITERATURA CITADA

- Advis, J. P; Andrews, W. W. . O. S. R. (1982). Studies on the central effect of prolactin in inducing precocious puberty in the female rat. *Brain Research Bulletin*, 8(5), 449–458. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(82\)90002-8](https://doi.org/10.1016/0361-9230(82)90002-8)
- Amenomori, Y., Chen, C. L., Meites, J., & Lansing, E. (1969). Serum Prolactin Levels in Rats During Different Reproductive States, 506–510.
- Belugin, S., Diogenes, A. R., Patil, M. J., Ginsburg, E., Henry, M. A., & Akopian, A. N. (2013). Mechanisms of transient signaling via short and long prolactin receptor isoforms in female and male sensory neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 288(48), 34943–34955. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.486571>
- Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., & Kelly, P. A. (1998). Prolactin (PRL) and Its Receptor: Actions, Signal Transduction Pathways and Phenotypes Observed in PRL Receptor Knockout Mice. *Endocrine Reviews*, 19(3), 225–268. <https://doi.org/10.1210/edrv.19.3.0334>
- Breer, H., Fleischer, J., & Strotmann, J. (2006). The sense of smell: Multiple olfactory subsystems. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(13), 1465–1475.

<https://doi.org/10.1007/s00018-006-6108-5>

Bridges, R. S., & Grattan, D. R. (2018). 30 Years After: CNS Actions of Prolactin: Source, Mechanism and Physiological Significance. *Journal of Neuroendocrinology*, 0–1.

<https://doi.org/10.1111/jne.12669>

Brown, R. S.E., Herbison, A. E., & Grattan, D. R. (2014). Prolactin regulation of kisspeptin neurones in the mouse brain and its role in the lactation-induced suppression of kisspeptin expression. *Journal of Neuroendocrinology*, 26(12), 898–908.

<https://doi.org/10.1111/jne.12223>

Brown, Rosemary S.E., Wyatt, A. K., Herbison, R. E., Knowles, P. J., Ladyman, S. R., Binart, N., ... Grattan, D. R. (2016). Prolactin transport into mouse brain is independent of prolactin receptor. *FASEB Journal*, 30(2), 1002–1010. <https://doi.org/10.1096/fj.15-276519>

Bruce, H. M. (1960). a Block To Pregnancy in the Mouse Caused By Proximity of Strange Males. *Reproduction*, 1(1), 96–103. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0010096>

Bruce, Hilda M. (1959). An exteroceptive block to pregnancy in the mouse. *Nature*, 184(4680), 105. <https://doi.org/10.1038/184105a0>

Byers, S. L., Wiles, M. V., Dunn, S. L., & Taft, R. A. (2012). Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS ONE*, 7(4), 1–5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035538>

Cabrera-Reyes, E. A., Limón-Morales, O., Rivero-Segura, N. A., Camacho-Arroyo, I., & Cerbón, M. (2017). Prolactin function and putative expression in the brain. *Endocrine*, 57(2), 199–213. <https://doi.org/10.1007/s12020-017-1346-x>

Canavan, S. V., Mayes, L. C., & Treloar, H. B. (2011). Changes in maternal gene expression in olfactory circuits in the immediate postpartum period. *Frontiers in Psychiatry*, 2(JUL), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2011.00040>

Carlitz, E. H. D., Runge, J. N., König, B., Winkler, L., Kirschbaum, C., Gao, W., & Lindholm, A. K. (2019). Steroid hormones in hair reveal sexual maturity and competition in wild house mice (*Mus musculus domesticus*). *Scientific Reports*, 9(1), 1–10.

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-53362-4>

de Moura, A. C., da Silva, I. R. V., Reinaldo, G., Dani, C., Elsner, V. R., & Giovenardi, M. (2016). Global Histone H4 Acetylation in the Olfactory Bulb of Lactating Rats with Different Patterns of Maternal Behavior. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 36(7), 1209–1213.

<https://doi.org/10.1007/s10571-015-0306-3>

- de Moura, A. C., Lazzari, V. M., Becker, R. O., Gil, M. S., Ruthschilling, C. A., Agnes, G., ... Giovenardi, M. (2015). Gene expression in the CNS of lactating rats with different patterns of maternal behavior. *Neuroscience Research*, *99*, 8–15.  
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2015.05.003>
- de Roux, N., Genin, E., Carel, J.-C., Matsuda, F., Chaussain, J.-L., & Milgrom, E. (2003). Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(19), 10972–10976. <https://doi.org/10.1073/pnas.1834399100>
- Döhler, K. D., & Wuttke, W. (1974). Serum LH, FSH, Prolactin and progesterone from birth to puberty in female and male rats. *Endocrinology*, *94*(4), 1003–1008.  
<https://doi.org/10.1210/endo-94-4-1003>
- Donhoffner, M. E., Al Saleh, S., Schink, O., & Wood, R. I. (2017). Prosocial effects of prolactin in male rats: Social recognition, social approach and social learning. *Hormones and Behavior*, *96*(323), 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2017.09.011>
- Drickamer, L. C. (1983). Mice selected for age of puberty: Reverse selection and reproductive characteristics. *Biology of Reproduction*, *28*(4), 843–848.  
<https://doi.org/10.1095/biolreprod28.4.843>
- Dulac, C., & Torello, A. T. (2003). Molecular detection of pheromone signals in mammals: From genes to behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, *4*(7), 551–562.  
<https://doi.org/10.1038/nrn1140>
- Freeman, M. E., Kanyicska, L., Lerant, A., Gy, A., Nagy, R., Kanyicska, B., ... Nagy, G. (2000). Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiological Reviews*, *80*(4), 1523–1631. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.4.1523>
- Freemark, M., Driscoll, P., Andrews, J., Kelly, P. A., & Royster, M. (1996). Ontogenesis of prolactin receptor gene expression in the rat olfactory system: Potential roles for lactogenic hormones in olfactory development. *Endocrinology*, *137*(3), 934–942.  
<https://doi.org/10.1210/endo.137.3.8603606>
- Freemark, M., Driscoll, P., Maaskant, R., Petryk, A., & Kelly, P. A. (1997). Ontogenesis of prolactin receptors in the human fetus in early gestation: Implications for tissue differentiation and development. *Journal of Clinical Investigation*, *99*(5), 1107–1117.  
<https://doi.org/10.1172/JCI119239>
- Georgescu, T., Ladyman, S. R., Brown, R. S. E., & Grattan, D. R. G. (2020). Acute effects of

- prolactin on hypothalamic prolactin receptor expressing neurones in the mouse. *BioRxiv*, 087650. <https://doi.org/10.1111/jne.12908>
- Goffin, V., Binart, N., Touraine, P., & Kelly, P. A. (2002). Prolactin: The New Biology of an Old Hormone. *Annual Review of Physiology*, 64(1), 47–67. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.081501.131049>
- Gonzalez, Dolores; López Francisco; Sánchez Criado, J. A. E. (1986). Two possible mechanisms for precocious puberty induced in female rats by pituitary grafts. *Neuroendocrinology*, 42(4), 323–327. <https://doi.org/10.1159/000124458>
- Gonzalez, M. D., L, F., & Aguilar, E. (1983). Involvement of prolactin in the onset of puberty in female rats. *Journal of Endocrinology*, 101, 63–68.
- Gorski Firlit, M., & Schwartz, N. B. (1977). Uncoupling of Vaginal Opening and the First Ovulation-An Indication of an Alteration in the Pituitary-Gonadal. *Biology of Reproduction*, 16, 441–444. <https://doi.org/10.1095/biolreprod16.4.441>
- Gorvin, C. M. (2015). The prolactin receptor: Diverse and emerging roles in pathophysiology. *Journal of Clinical and Translational Endocrinology*, 2(3), 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.jcte.2015.05.001>
- Gottsch, M. L., Cunningham, M. J., Smith, J. T., Popa, S. M., Acohido, B. V, Crowley, W. F., ... Steiner, R. A. (2004). A Role for Kisspeptins in the Regulation of Gonadotropin Secretion in the Mouse, 145(9), 4073–4077. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0431>
- Grattan, D. R., & Tissier, P. Le. (2015). *and the Multiple Reproductive Functions of Prolactin. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edi)*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00012-0>
- Guo, J., Zhou, A., & Moss, R. L. (1997). Urine and urine-derived compounds induce c-fos mRNA expression in accessory olfactory bulb. *NeuroReport*, 8(7), 1679–1683. <https://doi.org/10.1097/00001756-199705060-00024>
- Halpern, M., & Martínez-Marcos, A. (2003). Structure and function of the vomeronasal system: An update. *Progress in Neurobiology*, 70(3), 245–318. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(03\)00103-5](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(03)00103-5)
- Hashikawa, K., Hashikawa, Y., Falkner, A., & Lin, D. (2016). The neural circuits of mating and fighting in male mice. *Current Opinion in Neurobiology*, 38, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.01.006>

- Hellier, V., Brock, O., Candlish, M., Desroziers, E., Aoki, M., Mayer, C., ... Bakker, J. (2018). Kisspeptin neurons. *Nature Communications*, (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02797-2>
- Herbison, A. E., De Tassigny, X. D. A., Doran, J., & Colledge, W. H. (2010). Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*, *151*(1), 312–321. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0552>
- Imaoka, T., Matsuda, M., Mori, T. (1998). Expression of prolactin messenger ribonucleic acid in the mouse gonads during sexual maturation. *Life Sciences*, *63*(2), 2251–2258.
- Inamura, K., Kashiwayanagi, M., & Kurihara, K. (1999). Regionalization of Fos immunostaining in rat accessory olfactory bulb when the vomeronasal organ was exposed to urine. *European Journal of Neuroscience*, *11*(7), 2254–2260. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00646.x>
- JOHN G. VANDENBERGH, J. M. W. and J. R. L. (1974). PARTIAL ISOLATION OF A PHEROMONE ACCELERATING PUBERTY IN FEMALE MICE North Carolina Department of Mental Health , Research Division , Raleigh , changes have been termed priming pheromones ( Wilson & Bossert , 1963 ; Bioassay procedure Closed-colony , albi. *Journal of Reproductive Fertility*, *43*, 515–523.
- Jouhannau, M., Cornilleau, F., & Keller, M. (2014). Peripubertal exposure to male odors influences female puberty and adult expression of male-directed odor preference in mice. *Hormones and Behavior*, *65*(2), 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.12.006>
- Kensaku, M. (2016). *The Olfactory System. Conn's Translational Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802381-5.00029-4>
- Kimoto, H., & Touhara, K. (2005). Induction of c-Fos expression in mouse vomeronasal neurons by sex-specific non-volatile pheromone(s). *Chemical Senses*, *30 SUPPL.*(suppl 1), 146–147. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjh156>
- Kokay, I. C., Wyatt, A., Phillipps, H. R., Aoki, M., Ectors, F., Boehm, U., & Grattan, D. R. (2018). Analysis of prolactin receptor expression in the murine brain using a novel prolactin receptor reporter mouse. *Journal of Neuroendocrinology*, *30*(9), 1–20. <https://doi.org/10.1111/jne.12634>
- Kumar, A., Dudley, C. A., & Moss, R. L. (1999). Functional dichotomy within the vomeronasal system: distinct zones of neuronal activity in the accessory olfactory bulb correlate with

- sex-specific behaviors. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(20), 1–6. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-20-j0003.1999>
- Lanuza, E., Novejarque, A., Martínez-Ricós, J., Martínez-Hernández, J., Agustín-Pavón, C., & Martínez-García, F. (2008). Sexual pheromones and the evolution of the reward system of the brain: The chemosensory function of the amygdala. *Brain Research Bulletin*, 75(2–4), 460–466. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2007.10.042>
- Larriva-Sahd, J. (2008). The accessory olfactory bulb in the adult rat: A cytological study of its cell types, neuropil, neuronal modules, and interactions with the main olfactory system. *Journal of Comparative Neurology*, 510(3), 309–350. <https://doi.org/10.1002/cne.21790>
- Li, C. S., Kaba, H., Saito, H., & Seto, K. (1990). Neural mechanisms underlying the action of primer pheromones in mice. *Neuroscience*, 36(3), 773–778. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90019-Z](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90019-Z)
- Lledo, P.-M., Gheusi, G., & Vincent, J.-D. (2009). Information processing in the mammalian olfactory system. *Physiological Reviews*, 85(1), 281–317. <https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2004>
- Lomas, D. E., & Keverne, E. B. (1982). Role of the vomeronasal organ and prolactin in the acceleration of puberty in female mice. *Reproduction*, 66(1), 101–107. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0660101>
- Lyons, D. J., Hellysaz, A., & Broberger, C. (2012). Prolactin regulates tuberoinfundibular dopamine neuron discharge pattern: Novel feedback control mechanisms in the lactotrophic axis. *Journal of Neuroscience*, 32(23), 8074–8083. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0129-12.2012>
- Mak, G. K., Enwere, E. K., Gregg, C., Pakarainen, T., Poutanen, M., Huhtaniemi, I., & Weiss, S. (2007). Male pheromone-stimulated neurogenesis in the adult female brain: Possible role in mating behavior. *Nature Neuroscience*, 10(8), 1003–1011. <https://doi.org/10.1038/nn1928>
- Marco-Manclus, P., Paredes, R. G., & Portillo, W. (2020). Sexual experience with a known male modulates c-Fos expression in response to mating and male pheromone exposure in female mice. *Physiology and Behavior*, 222(April), 112906. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.112906>
- Martín-López, E., Corona, R., & López-Mascaraque, L. (2012). Postnatal characterization of cells in the accessory olfactory bulb of wild type and reeler mice. *Frontiers in*

- Neuroanatomy*, 6(May), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnana.2012.00015>
- Martínez-Marcos, A., & Halpern, M. (1999). Differential centrifugal afferents to the anterior and posterior accessory olfactory bulb. *NeuroReport*, 10(10), 2011–2015. <https://doi.org/10.1097/00001756-199907130-00004>
- McGregor, I. S., Hargreaves, G. A., Apfelbach, R., & Hunt, G. E. (2004). Neural Correlates of Cat Odor-Induced Anxiety in Rats: Region-Specific Effects of the Benzodiazepine Midazolam. *Journal of Neuroscience*, 24(17), 4134–4144. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0187-04.2004>
- Michael, S. D., Kaplan, S. B., & Macmillan, B. T. (1980). Peripheral plasma concentrations of LH, FSH, prolactin and GH from birth to puberty in male and female mice. *Journal of Reproduction and Fertility*, 59(1), 217–222. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0590217>
- Michael, Sandra D. (1976). (39522) Sandra D . Michael, 257, 254–257. <https://doi.org/10.1080/19443994.2012.699359>
- Mohedano-Moriano, A., Pro-Sistiaga, P., Úbeda-Bañón, I., Crespo, C., Insausti, R., & Martínez-Marcos, A. (2007). Segregated pathways to the vomeronasal amygdala: Differential projections from the anterior and posterior divisions of the accessory olfactory bulb. *European Journal of Neuroscience*, 25(7), 2065–2080. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05472.x>
- Morales, T. (2011). Recent findings on neuroprotection against excitotoxicity in the hippocampus of female rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 23(11), 994–1001. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02141.x>
- Nagano, M., & Kelly, P. A. (1994). Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression. Quantitative analysis by polymerase chain reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 269(18), 13337–13345.
- Nagayama, S., Homma, R., & Imamura, F. (2014). Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Frontiers in Neural Circuits*, 8(September), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00098>
- Nelson, F., Felicio, S., & Johnson, E. (1990). Influences on the Timing of Puberty in Mice<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, 655, 649–655.
- Nelson, J. F., Karelus, K., Felicio, L. S., & Johnson, T. E. (1990). Genetic influences on the timing of puberty in mice. *Biology of Reproduction*, 42(4), 649–655.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod42.4.649>

- Norlin, M., Gussing, F., & Berghard, A. (2003). Vomeronasal Phenotype and Behavior Alterations in Gai2 Mutant Mice. *Current Biology*, 13, 654–658. <https://doi.org/10.1016/S>
- Oboti, L., Trova, S., Schellino, R., Marraudino, M., Harris, N. R., Abiona, O. M., ... Peretto, P. (2017). Activity dependent modulation of granule cell survival in the accessory olfactory bulb at puberty. *Frontiers in Neuroanatomy*, 11(May), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00044>
- Pineda, R., Millar, R. P., & Ludwig, M. (2017). Amygdala Kisspeptin Neurons : Putative Mediators of Olfactory Control of the Gonadotropic Axis, 223–238. <https://doi.org/10.1159/000445895>
- Plant, T. M. (2002). Neurophysiology of puberty. *Journal of Adolescent Health*, 31(6 SUPPL.), 185–191. [https://doi.org/10.1016/S1054-139X\(02\)00484-6](https://doi.org/10.1016/S1054-139X(02)00484-6)
- Platel, J.-C., Angelova, A., Bugeon, S., Wallace, J., Ganay, T., Chudotvorova, I., ... Cremer, H. (2019). Neuronal integration in the adult mouse olfactory bulb is a non-selective addition process. *ELife*, 8, 1–21. <https://doi.org/10.7554/elife.44830>
- Pomeroy, S. L., LaMantia, A. S., & Purves, D. (1990). Postnatal construction of neural circuitry in the mouse olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, 10(6), 1952–1966. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.10-06-01952.1990>
- Ravi, N., Li, Z., Oettl, L.-L., Bartsch, D., Schonig, K., & Kelsch, W. (2015). Postnatal subventricular zone progenitors switch their fate to generate neurons with distinct synaptic input patterns. *Development*, 142(2), 303–313. <https://doi.org/10.1242/dev.110767>
- Ravi, Namasivayam, Sanchez-Guardado, L., Lois, C., & Kelsch, W. (2017). Determination of the connectivity of newborn neurons in mammalian olfactory circuits. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(5), 849–867. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2367-y>
- Reis, F. M., Polisseni, F., Pereira, V. M., Cassali, G. D., Reis, A. M., Faletti, A. G., & Camargos, A. F. (2004). Effect of the pretreatment with prolactin on the distribution of immunoreactive beta-endorphin through different ovarian compartments in immature, superovulated rats. *Journal of Molecular Histology*, 35(8–9), 759–764. <https://doi.org/10.1007/s10735-004-0570-x>
- Rodriguez, I & Boehm, U. (2009). Pheromone sensing in mice. In *Chemosensory systems in mammals, fishes and insects* (p. 272).

- Rosas-Hernandez, H., Ramirez, M., Ramirez-Lee, M. A., Ali, S. F., & Gonzalez, C. (2015). Inhibition of prolactin with bromocriptine for 28days increases blood-brain barrier permeability in the rat. *Neuroscience*, *301*, 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.05.066>
- Rosser, A. E., Remfry, C. J., & Keverne, E. B. (1989). Restricted exposure of mice to primer pheromones coincident with prolactin surges blocks pregnancy by changing hypothalamic dopamine release. *Journal of Reproduction and Fertility*, *87*(2), 553–559. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0870553>
- Russell, D. L., & Richards, J. A. S. (1999). Differentiation-dependent prolactin responsiveness and stat (signal transducers and activators of transcription) signaling in rat ovarian cells. *Molecular Endocrinology*, *13*(12), 2049–2064. <https://doi.org/10.1210/mend.13.12.0389>
- Saenger, P. (2003). Dose effects of growth hormone during puberty. *Hormone Research*, *60*(SUPPL. 1), 52–57. <https://doi.org/10.1159/000071226>
- Seminara, S. B., Messenger, S., Chatzidaki, E. E., Thresher, R. R., Acierno, J. S., Shagoury, J. K., ... Colledge, W. H. (2004). The GPR54 Gene as a Regulator of Puberty. *Obstetrical & Gynecological Survey*, *59*(5), 351–353. <https://doi.org/10.1097/00006254-200405000-00020>
- Serguera, C., Triaca, V., Kelly-barrett, J., Banhaabouchi, M. Al, & Minichiello, L. (2008). Increased dopamine after mating impairs olfaction and prevents odor interference with pregnancy. *Nature Neuroscience*, *11*(8), 949–956. <https://doi.org/10.1038/nn.2154>
- Shingo, T., Gregg, C., Enwere, E., Fujikawa, H., Hassam, R., Geary, C., ... Weiss, S. (2003). Pregnancy-Stimulated Neurogenesis in the Adult Female Forebrain Mediated by Prolactin, *299*(January), 117–121.
- Silveira, M. A., Furigo, I. C., Zampieri, T. T., Bohlen, T. M., de Paula, D. G., Franci, C. R., ... Frazao, R. (2017). STAT5 signaling in kisspeptin cells regulates the timing of puberty. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *448*, 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.03.024>
- Sinha, Y. N., Salocks, C. B., & Vanderlaan, W. P. (1975). Prolactin and growth hormone levels in different inbred strains of mice: Patterns in association with estrous cycle, time of day, and perphenazine stimulation. *Endocrinology*, *97*(5), 1112–1122. <https://doi.org/10.1210/endo-97-5-1112>
- Smith, J. T., Cunningham, M. J., Rissman, E. F., Clifton, D. K., & Steiner, R. A. (2005).

- Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology*, 146(9), 3686–3692. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0488>
- Suárez, R., García-González, D., & de Castro, F. (2012). Mutual influences between the main olfactory and vomeronasal systems in development and evolution. *Frontiers in Neuroanatomy*, 6(NOV), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnana.2012.00050>
- Tani, N., Ikeda, T., Watanabe, M., Toyomura, J., Ohyama, A., & Ishikawa, T. (2018). Prolactin selectively transported to cerebrospinal fluid from blood under hypoxic/ ischemic conditions. *PLoS ONE*, 13(6), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198673>
- Terasawa, E.; Ojeda, S. (2009). Neuroendocrine Regulation of Puberty. In *Hormones, Brain and Behavior, online*. (pp. 2035–2113).
- Trimmer, C., & Mainland, J. D. (2017). *The Olfactory System. Conn's Translational Neuroscience*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802381-5.00029-4>
- Vandenbergh, J. G. (1969). Male odor accelerates female sexual maturation in mice. *Endocrinology*, 84(3), 658–660. <https://doi.org/10.1210/endo-84-3-658>
- Vazquez, M. J., Toro, C. A., Castellano, J. M., Ruiz-Pino, F., Roa, J., Beiroa, D., ... Tena-Sempere, M. (2018). SIRT1 mediates obesity- and nutrient-dependent perturbation of pubertal timing by epigenetically controlling Kiss1 expression. *Nature Communications*, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06459-9>
- Von Campenhausen, H., & Mori, K. (2000). Convergence of segregated pheromonal pathways from the accessory olfactory bulb to the cortex in the mouse. *European Journal of Neuroscience*, 12(1), 33–46. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00879.x>
- Yoon, H., Enquist, L. W., & Dulac, C. (2005). Olfactory inputs to hypothalamic neurons controlling reproduction and fertility. *Cell*, 123(4), 669–682. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.039>