

11781



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

**INSTITUTO DE  
NEUROBIOLOGIA**  
*CAMPUS UNAM-UAQ, JURIQUILLA, QRO.*

**“FACTORES SENSORIALES, ENDOCRINOS Y  
NEUROBIOLOGICOS RESPONSABLES DE LA  
AUSENCIA DE CONDUCTA SEXUAL EN  
RATAS MACHO NO COPULADORAS”.**

**Tesis**  
QUE PARA OBTENER EL  
GRADO  
DE DOCTOR EN CIENCIAS  
BIOMEDICAS  
(NEUROBIOLOGIA)

P R E S E N T A :  
M. en C. Wendy Portillo Martínez

DIRECTOR DEL PROYECTO : DR. RAUL G. PAREDES  
GUERRERO.



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.

**CREDITOS.**

La presente tesis fue realizada en el laboratorio de "Conducta Sexual y Plasticidad" del Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva del Instituto de Neurobiología Campus UNAM-UAQ.

Con el apoyo del Programa de Becas Nacionales para Estudios de Posgrado (complemento) de la UNAM y con Beca Nacional del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología becario 144381.

autorizo a la Biblioteca de la UNAM a difundir en formato electrónico o impreso el contenido de este trabajo de posgrado  
firmado Wardy Porlillo  
en Huixtla  
el día 21-May-04  
firmado Wardy

Resumen .....	1
Abstract.....	4
Introducción	
Capítulo 1. Descripción de la conducta sexual masculina.....	5
Capítulo 2. Control hormonal de la conducta sexual masculina.....	11
2.1.- Andrógenos .....	13
2.2.- Estrógenos .....	15
2.3.- Aromatasa.....	16
2.4.- Receptores a andrógenos y estrógenos.....	18
Capítulo 3. Control neuronal de la conducta sexual masculina.....	21
3.1.- Descripción del sistema de proyección vomeronasal.....	22
a) Organó vomeronasal.....	23
b) Bulbo olfatorio accesorio.....	24
c) Amígdala.....	26
d) Núcleo de la cama de la estría terminal.....	27
e) Área preóptica media.....	28
3.2.- El sistema de proyección vomeronasal y Fos .....	33
Capítulo 4. Machos no-copuladores.....	36
4.1.- Cabra.....	36
4.2.- Gerbo.....	37

4.3.- Conejillo de indias, hámster y ratón .....	37
4.4.- Rata.....	38
Hipótesis .....	41
Objetivos .....	41
Capítulo 5. Experimentos	
5.1.- Métodos generales .....	42
5.2 Experimento 1.- Coordinación motora fina y preferencia de lugar condicionada en las ratas macho no-copuladoras	
a) Antecedentes.....	44
b) Método.....	46
c) Análisis estadístico.....	49
d) Resultados.....	49
e) Conclusiones .....	52
5.3 Experimento 2.- Conducta sexual femenina en ratas macho no-copuladoras.	
a) Antecedentes.....	53
b) Método.....	54
c) Análisis estadístico.....	55
d) Resultados.....	55
e) Conclusiones.....	60

5.4 Experimento 3.- Motivación sexual, preferencia olfatoria y activación del sistema de proyección vomeronasal por claves sexualmente relevantes en ratas macho no-copuladoras y sexualmente inexpertas.

a) Antecedentes.....	63
b) Método.....	65
c) Análisis estadístico.....	69
d) Resultados.....	69
e) Conclusiones.....	76

5.5 Experimento 4.- Niveles sanguíneos de testosterona y estradiol y actividad de la enzima aromatasa en las ratas macho no-copuladoras.

a) Antecedentes.....	79
b) Método.....	80
c) Análisis estadístico.....	83
d) Resultados.....	83
e) Conclusiones.....	85

5.6 Experimento 5.- Cuantificación del número de receptores a andrógenos y estrógenos tipo  $\alpha$  en la rata macho no-copuladora.

a) Antecedentes.....	87
b) Método.....	88
c) Análisis estadístico.....	89
f) Resultados.....	90
g) Conclusiones.....	95

Capítulo 6. Discusión y conclusiones generales .....97

Referencias .....111

## Resumen

Se ha documentado que existen machos aparentemente normales los cuales cuando tiene libre acceso a las hembras en estro no copulan. Estos animales denominados machos “no-copuladores” no tienen alteraciones en los mecanismos que controlan la erección, los movimientos peneanos y la eyaculación. Con base en las evidencias encontradas en nuestro grupo de investigación, propusimos que las ratas macho no-copuladoras pueden tener una alteración funcional a nivel del sistema nervioso central específicamente en la actividad del área preóptica media. Debido a los pocos estudios sobre este tipo de animales fue necesario realizar una caracterización conductual del macho no-copulador para tratar de determinar las causas de su déficit conductual. En el presente trabajo aplicamos una batería de pruebas conductuales a las ratas macho no-copuladoras que nos permitiera determinar si otras conductas relacionadas a la sexual están alteradas. Un segundo objetivo fue evaluar si en los machos no-copuladores la actividad neuronal del área preóptica media es normal durante el procesamiento de olores de hembras en estro y si el número de receptores a andrógenos, estrógenos tipo  $\alpha$ , así como la actividad de la enzima aromataza (enzima que metaboliza la testosterona a estradiol) es normal en estos animales. El área preóptica media forma parte del sistema vomeronasal y la integridad de las estructuras que conforman a este sistema son fundamentales para la ejecución de la conducta sexual masculina, por lo que en este trabajo también incluimos el estudio de estas estructuras.

Para una mejor comprensión de nuestro trabajo los datos fueron agrupados en los siguientes experimentos: 1) Evaluamos si los machos no-copuladores tienen alteraciones en la coordinación motora fina de sus movimientos que les impidan copular y determinamos si estas ratas no copulan debido a que no sea posible inducirles estados afectivos positivos. 2) Determinamos si los machos no-copuladores están conductualmente feminizados. 3) Evaluamos si los machos no-copuladores prefieren a las hembras en estro y sus olores de los machos sexualmente activos y evaluamos si la actividad neuronal del sistema de proyección vomeronasal es normal en los machos no-copuladores durante el procesamiento de los olores provenientes de las hembras en estro. En los aspectos hormonales: 4) Cuantificamos los niveles sanguíneos de testosterona y estradiol y evaluamos la actividad

de la enzima aromatasa. Finalmente 5) Cuantificamos el número de neuronas inmunorreactivas a receptores a andrógenos y estrógenos tipo  $\alpha$ .

Nuestros datos demuestran que los machos no-copuladores no tuvieron alteraciones en la coordinación motora fina de sus movimientos. Por lo tanto podemos suponer que este déficit conductual no se debe que estos machos no puedan coordinar sus movimientos para acercarse a las hembras en estro e iniciar la conducta sexual masculina. Estos animales tampoco tuvieron alteraciones en su sistema general de motivación, ya que fueron capaces de asociar un estado afectivo positivo inducido por la administración de morfina con un ambiente determinado.

Ya que los machos no-copuladores no ejecutan la conducta sexual masculina, evaluamos si es posible potenciar en estas ratas la conducta sexual femenina. Los datos mostraron que los machos no-copuladores y copuladores presentaron bajos niveles de receptividad femenina independientemente del tratamiento hormonal empleado, sugiriendo que los machos no-copuladores no están feminizados conductualmente.

En el experimento 3, demostramos que los machos no-copuladores en pruebas de motivación sexual no prefirieron a las hembras en estro con respecto a los machos sexualmente expertos. Estas deficiencias pueden deberse a que los machos no-copuladores aunque prefirieron los olores de las hembras en estro de los olores neutros esta preferencia es menor a la observada en los machos copuladores. También demostramos que mientras en los machos copuladores se incrementó la actividad neuronal de todas las estructuras del sistema de proyección vomeronasal en respuesta a la detección de los olores de las hembras en estro, en los machos no-copuladores solamente se observó un incremento en la capa mitral del bulbo olfatorio accesorio.

En el experimento 4, demostramos que los niveles sanguíneos de testosterona y estradiol fueron normales en los machos no-copuladores. La actividad de la enzima aromatasa en los machos no-copuladores fue menor en el área preóptica media y normal en el núcleo de la cama de la estría terminal, el hipotálamo anterior, el núcleo ventro medial del hipotálamo y la amígdala. En la cuantificación del número de receptores encontramos que los machos no-copuladores tienen un mayor número de receptores a andrógenos en el área preóptica media y en la amígdala anterior y posterior. En cuanto a los receptores a

estrógenos  $\alpha$  encontramos que estos están incrementados en los machos no-copuladores en la amígdala anterior y posterior con respecto a los machos copuladores. En el área preóptica media encontramos que los machos no-copuladores tienen un menor número de receptores a estrógenos tipo  $\alpha$  que los copuladores. Con base en los experimentos anteriores, proponemos que las deficiencias conductuales en los machos no-copuladores pueden deberse a que estas ratas no prefieren a las hembras sexualmente receptivas debido a que tienen una preferencia deficiente por sus olores. Esta deficiencia puede darse a nivel de la integración neuronal de este tipo de estímulos, ya que la actividad neuronal del sistema de proyección vomeronasal de los machos no-copuladores es deficiente cuando estos animales son expuestos a olores de hembras en estro. Esta reducción en la actividad neuronal puede ser causada por alteraciones hormonales a nivel de los receptores a andrógenos y estrógenos. Nosotros proponemos que en los machos no-copuladores los receptores a andrógenos están sobrerregulados en el área preóptica media probablemente porque la actividad de la enzima aromatasa en esta estructura está disminuida lo que puede generar altos niveles locales de testosterona y bajos niveles de estradiol.

## Abstract

There are male rats that fail to mate even if they are repeatedly tested with receptive females. These rats are called “noncopulators (NC)”. We have proposed that the NC males have a neuronal alteration in the medial preoptic area (MPOA). In the present experiment we characterized the NC male rats, and demonstrated that this males are not behavioral feminized and do not have alteration in their motor coordination that prevent to approach and mate with the females. As well, NC males do not show partner and odor preference for receptive females. Sexually relevant odors are detected by the vomeronasal projection pathway (VN pathway that include the MPOA). In NC males the VN pathway is not activated during estrous odors processing. At the hormonal level, we found that in NC males plasmatic levels of testosterone and estradiol are normal. However, this rats have a higher number of androgen receptors in the amigdala (AMG) and MPOA than C rats, estrogen receptors alpha are up-regulated in the AMG and down-regulated in the MPOA of NC males. Finally, NC males rats showed a reduced aromatasa activity (AA) in the MPOA but not in other structures of the VN pathway. Alterations in the number of steroid receptors and AA in the MPOA of NC males suggested that the levels of testosterone and estradiol are modified in this structures, and this changes can be the cause of this behavioral deficit. Our data supported the hypothesis that the NC have a neuronal alterations in the MPOA.

## Capítulo 1. Descripción de la conducta sexual en la rata macho.

En la conducta sexual de los mamíferos se pueden identificar dos componentes: el primero precopulatorio o motivacional, lleva al sujeto a la búsqueda y al inicio de la interacción con la pareja sexual y el segundo consumatorio o de ejecución, permite llevar a cabo dicha interacción (Beach, 1967). Sobre estos dos componentes actúa un mecanismo modulador que inhibe la expresión de la conducta sexual en condiciones inapropiadas como la presencia de depredadores, la cual puede poner en peligro la sobrevivencia de la pareja (para revisión veáse Beyer 1976; Wallen y Schneider, 2000).

Las conductas precopulatorias duran desde unos cuantos segundos, minutos o incluso horas dependiendo de la especie y de la experiencia sexual previa. En la rata estas conductas consisten básicamente en el olfato de la región perineal, la exploración genital y el asco del compañero (Hlinák, 1986; Hlinák y col., 1987; Hlinák, 1990). En esta fase la hembra además despliega conductas de atracción como son el brincoteo, desplazamiento en zig-zag y movimientos repetidos de las orejas (revisión en Blaustein y Erskine, 2002). Durante este periodo los roedores de ambos sexos pueden emitir vocalizaciones ultrasónicas. Dichos sonidos tienden a aumentar la excitación de la pareja y la propia excitación del animal emisor (Knutson, 2002; McIntosh y Barfield, 1980; Pomerantz y Clemens, 1981; White et al., 1990). Así mismo, se ha demostrado que si la estimulación producida por el compañero durante la fase precopulatoria no es la adecuada es muy probable que la cópula no se lleve a cabo. Por ejemplo, se ha demostrado que los tratamientos farmacológicos que reducen las conductas precopulatorias, inhiben también el coito (Paredes y Agmo, 1989). De esta forma los trabajos de Hlinák y colaboradores (1986 y 1987) demostraron que la transición de la fase precopulatoria a la copulatoria es un aspecto importante no sólo de la potencia sexual temporal del macho sino también de su potencia sexual permanente, esta transición parece ser clave en la interacción sexual.

Por otra parte, la conducta copulatoria en la rata macho consiste en tres patrones conductuales altamente estereotipados (Figura 1), los cuales son:

- a) Montas.- En este patrón el macho se posa sobre la parte posterior de la hembra y realiza una serie de movimientos pélvicos, no se presenta inserción penéana y su patrón de desmonta no es estereotipado. En ocasiones esta conducta puede ir seguida por el acicalamiento genital.
- b) Intromisión.- Ocurre cuando durante una monta el pene se inserta en la vagina de la hembra, además de exhibir inicialmente los movimientos propios de la monta, la desmonta difiere por tratarse de un movimiento pélvico intenso seguido por una brusca retirada, después de la cual el macho puede lamerse el pene.
- c) Eyaculación.- Se presenta después de un cierto número de intromisiones y se caracterizan por ser montas que terminan en movimientos repetidos de los miembros anteriores. La penetración es de una duración más larga y la desmonta es muy lenta. La eyaculación es una fuerte expulsión de líquido seminal y espermatozoides desde el cuerpo del macho. La expulsión del esperma generalmente se acompaña por contracciones espasmódicas de la musculatura esquelética, principalmente de los miembros anteriores y posteriores, así como de los músculos estriados de la región perineal, que incluyen al isquiocavernoso, al bulbo esponjoso y al esfínter anal. Después de la eyaculación el patrón de desmonta no es estereotipado y por lo general es seguido de acicalamiento genital.

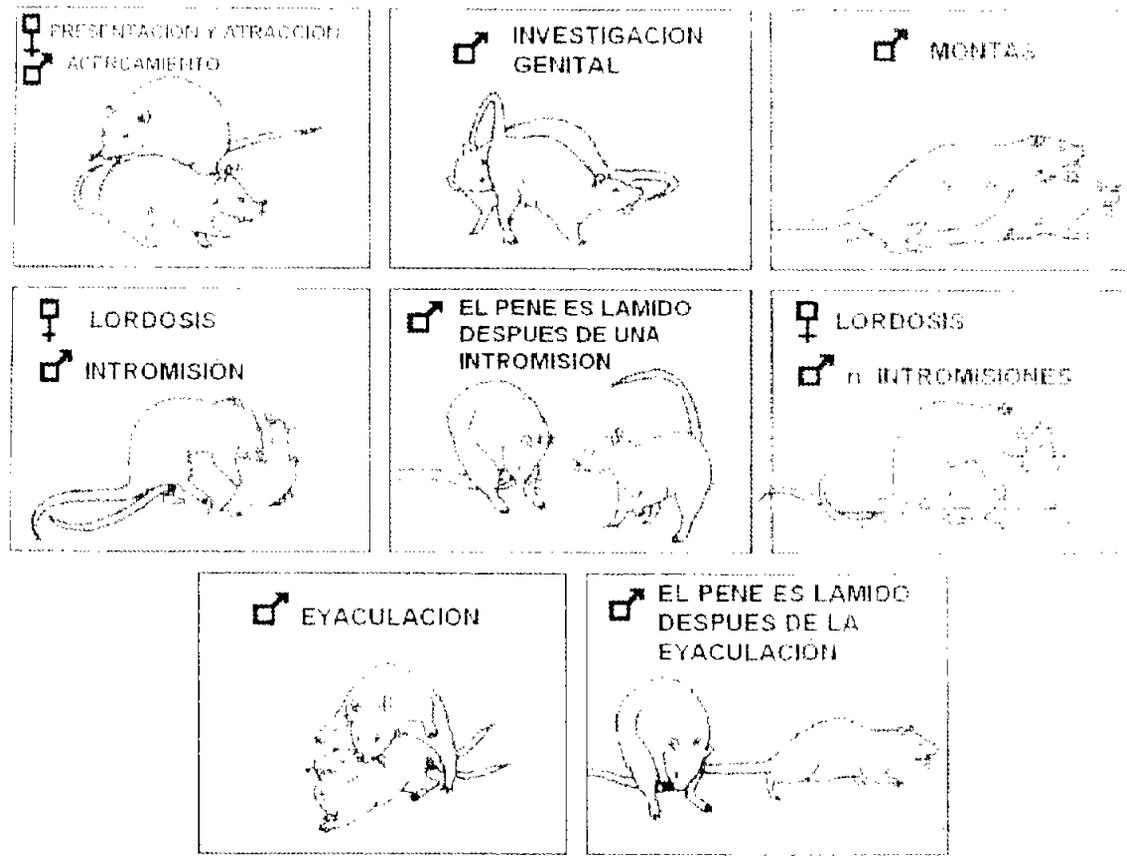


Figura 1. - Patrones observados durante la conducta sexual masculina en la rata (tomado de Slob y Van der Werff, 1997).

Durante la cópula el macho puede o no mostrar montas y el número de intromisiones antes de eyacular varía entre 8 y 15. Se considera que un macho experto puede eyacular después de 10 a 15 minutos de estar en contacto con una hembra sexualmente receptiva (estro). Al conjunto de patrones sexuales que presenta un macho desde que entra en contacto con la hembra en estro hasta que eyacula se le denomina serie copulatoria. Después de terminar una serie copulatoria se presenta un intervalo de 4 a 5 minutos en el que el macho no responde a una nueva estimulación sexual, a este período se le ha denominado intervalo posteyaculatorio (Larson, 1956). Este comprende dos fases: una larga denominada “período refractario absoluto”, el cual abarca el primer 75% de la duración del intervalo posteyaculatorio, y se caracteriza porque el macho no tiene actividad sexual (Sachs y Bialy, 2000) y emite vocalizaciones ultrasónicas a 22kHz (Barfield y Geyer, 1975, Sachs y Bialy, 2000). La segunda fase es más corta y corresponde al “período refractario relativo”, durante este lapso de tiempo el macho monta a la hembra si esta lo estimula adecuadamente (Beach y Hultz-Tucker, 1949; Pollak y Sachs, 1975).

Para que la cópula se lleve a cabo es necesario, que las hembras se encuentren sexualmente receptivas. La receptividad se manifiesta de distintas formas según la especie, pero en todos los casos implica la adopción de una postura que facilita la inserción y permanencia del pene dentro de la vagina y como consecuencia, la eyaculación dentro de ella (Moralí y Beyer, 1979). En las ratas se presenta la llamada respuesta de lordosis (Figura 2) la cual consiste en arquear el lomo de forma que la cabeza y el periné se encuentren elevados y la cola desviada hacia un lado (revisión en Blaustein y Erskine, 2002).

La conducta sexual es ejecutada por la mayoría de los individuos de todas las especies de mamíferos, sin embargo en especies como: la cabra, el conejillo de indias, el gerbo, el hámster, la rata y el ratón, se ha reportado la existencia de machos aparentemente normales que no muestran la conducta sexual a pesar de ser probados en repetidas ocasiones con hembras sexualmente receptivas (Alexander et al., 1999; Alexander et al., 2001; Anderson, 1936; Beach, 1942; Clark et al., 1992; Clark et al., 2000; Perkins et al., 1992). Estos animales han sido denominados machos no-copuladores. La causa de este déficit conductual aun se desconoce. En nuestro laboratorio estamos interesados en determinar los factores involucrados en la ausencia de conducta sexual masculina en la rata

macho no-copuladora. Nosotros consideramos que es necesario primero realizar una caracterización conductual de estos animales para posteriormente evaluar la participación de algunos factores hormonales y neuronales fundamentales en el control de la conducta sexual masculina que pudieran estar alterados en los machos no-copuladores. Las hormonas actúan principalmente a nivel del sistema nervioso central para controlar la conducta sexual y el sustrato neuronal permite o inhibe la liberación de las hormonas. Por lo anterior, en los siguientes capítulos describiré brevemente el papel de las hormonas (andrógenos y estrógenos) y de las estructuras neuronales más importantes en el control de la conducta sexual masculina.

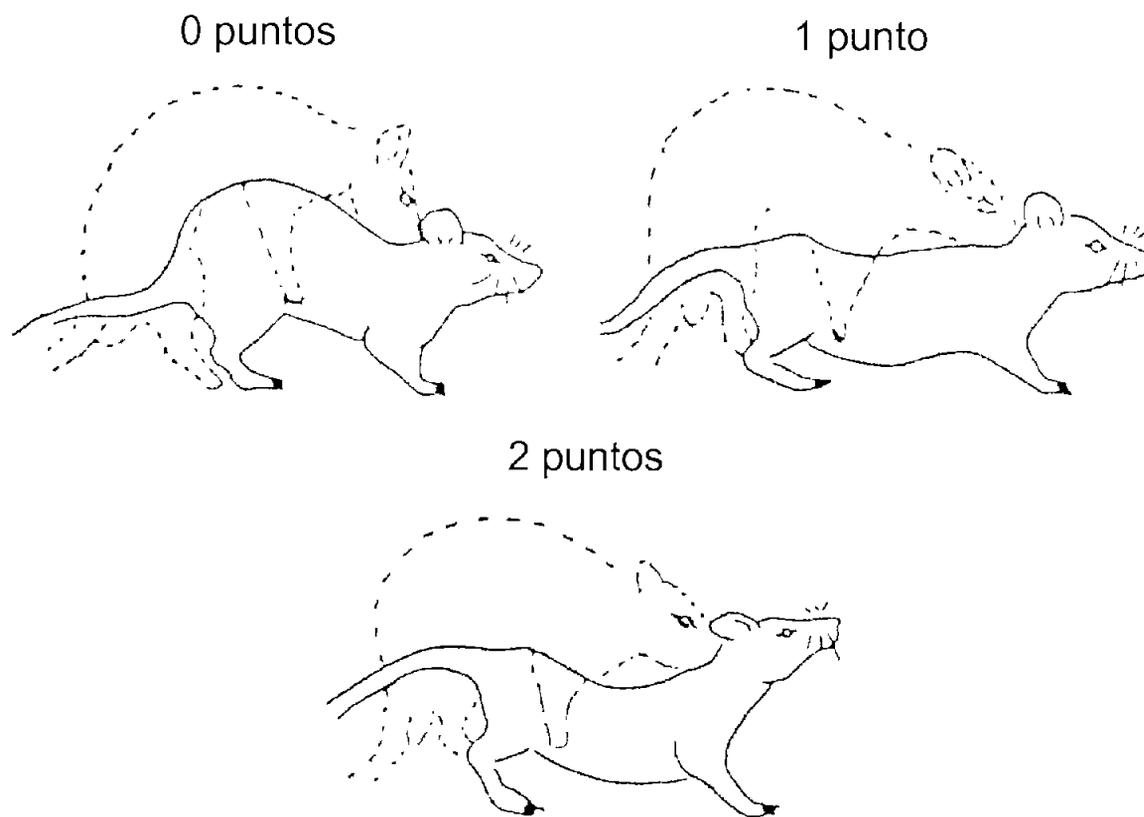


Figura 2.- Esquema de la intensidad de lordosis. Intensidad 0 si no se observa conducta de lordosis, intensidad 1 si se observa una lordosis parcial la cual consiste en desviar lateralmente la cola, flexionar la espalda y extender el cuello e intensidad 2 si se observa una lordosis completa caracterizada por la desviación de la cola con una flexión pronunciada de la espalda y extensión del cuello.

## Capítulo 2. Control hormonal de la conducta sexual masculina.

Al final de la década de los años 50's y durante la de los 60's, se demostró que la actividad de los esteroides gonadales durante la vida perinatal del sujeto, son fundamentales para establecer el dimorfismo sexual y para que en la edad adulta las conductas reproductivas típicas de cada sexo se presenten en forma normal. Los esteroides sexuales actúan fundamentalmente de dos formas. La primera es organizacional, esto es, organizan en un período temprano del desarrollo las vías neuronales involucradas en las conductas reproductivas. La segunda forma de acción es de tipo activacional, esto es, cuando el organismo es adulto estas hormonas activan las vías neuronales ya organizadas para que se lleven a cabo las conductas que dichas vías controlan (Phoenix et al., 1959). El efecto activador es facilitador o permisivo ya que los esteroides gonadales incrementan la probabilidad de que las conductas reproductivas ocurran ante el estímulo apropiado (McEwen et al., 1970). La función activadora puede ser reversible, ya que la gonadectomía en hembras y machos genera una disminución de la conducta sexual, que puede recuperarse administrando una terapia de reemplazamiento hormonal (Putnam et al., 2001; Thorton, 1986).

Por otro lado, la función organizacional depende de la testosterona. Si durante el período crítico el cerebro es expuesto a grandes cantidades de esta hormona, este se masculiniza y como consecuencia cuando el sujeto llega a la edad adulta es capaz de presentar conductas sexuales masculinas. Si por el contrario, no es expuesto a dicha hormona el animal adulto presenta conductas típicamente femeninas (Baum, 1979; MacLusky y Naftolin, 1981; Phoenix et al., 1959, Rhees et al., 1997).

En la rata, la testosterona se detecta prenatalmente en los días 18 y 19 de gestación (Baum et al., 1991; Cooke et al., 1998; Weisz y Ward, 1980). Durante el período postnatal, en los machos se observa un incremento en los niveles de testosterona durante las dos primeras horas de vida, seguido de un decremento a las 6 horas (Baum et al., 1988; Corbier et al., 1978; Slob et al., 1981). De tal manera que después del nacimiento y hasta el día 10 de vida los niveles de testosterona son más altos en los machos que en las hembras. Posteriormente disminuyen y permanecen bajos en ambos sexos hasta la pubertad, cuando

nuevamente en los machos incrementan los niveles de testosterona en comparación con las hembras (Selmanoff et al., 1977; Olster y Blaustein, 1988).

La función activadora de los esteroides gonadales se inicia en la pubertad. En los machos se requiere de la testosterona y de sus metabolitos para que se lleve a cabo la maduración de los espermatozoides y la expresión de la conducta sexual masculina (Killian et al., 2003; Morali, 1998; O'Donnell et al., 1999), mientras que en las hembras es necesario un incremento en la liberación cíclica de las gonadotropinas, para inducir la ovulación y la secreción de estradiol y progesterona, las cuales activan la conducta sexual femenina (revisión en Blaustein y Erskine, 2002).

El papel de los andrógenos en el control de la conducta sexual masculina se ha evaluado durante las diferentes etapas de la vida de los sujetos. Por ejemplo, se ha demostrado que la exposición en el útero a los antiandrógenos como el vinclozolin, el linuron, la flutamida (agonistas competitivos del receptor a andrógenos) y el di (n-butyl) palato (inhibidor de la biosíntesis de testosterona), inducen cambios permanentes en el fenotipo de los machos como disminución de la distancia anogenital, incrementos en la retención de los pezones, hipospadias y otras malformaciones del epidídimo y vasos deferentes. Además se han reportado decrementos en el peso de los testículos, la próstata y las vesículas seminales (Barlow y Foster, 2003; Imperato-McGinley, 1992; McIntyre et al., 2002; Mylchreest, 2000).

En los mamíferos adultos, la gonadectomía genera una reducción de los niveles hormonales después de 24 horas de la cirugía (Krey y McGinnis, 1990) que conlleva a una reducción de la conducta sexual masculina, al inicio el macho pierde su capacidad para eyacular después se observa una reducción en el número de montas con intromisiones, hasta que el animal ya no es capaz de montar a las hembras en estro (Beach y Pauker, 1949; Grunt y Young, 1953; Larsson, 1979; Rosenblatt y Aronson, 1958). Estos efectos pueden ser revertidos mediante el tratamiento con testosterona; en los machos gonadectomizados, después de varias semanas de la cirugía, se restablece la conducta sexual masculina de 5 a 10 días posteriores al inicio del tratamiento hormonal (McGinnis y Dreifuss, 1989; Putnam et al., 2001), las montas son las primeras en ser restablecidas, seguidas de la recuperación de la intromisión y finalmente de la eyaculación (Larson, 1979). La gonadectomía no sólo

disminuye la cópula, también afecta los aspectos motivacionales de la conducta sexual masculina. Por ejemplo, se ha demostrado que los machos gonadalmente intactos prefieren a las hembras en estro en lugar de los machos sexualmente activos (pruebas de preferencia sexual), si las ratas son gonadectomizadas esta preferencia declina rápidamente y sólo se restaura con tratamientos de propionato de testosterona o benzoato de estradiol (Agmo, 2003; López et al., 1999; Paredes et al., 1998; Vega Matuszczyk et al., 1994). La rata macho utiliza principalmente su sentido del olfato para identificar y preferir a las hembras en estro (Curtis et al., 2001; Edward et al., 1996; Kelliher y Baum, 2002; Ninomiya y Kimura, 1988; Petrulis et al., 1999). De esta manera, los machos gonadalmente intactos prefieren los olores de las hembras en estro en lugar de los olores de los machos o de las hembras en anestro (pruebas de preferencia olfatoria). Si estos animales son gonadectomizados pierden la capacidad de discriminar entre los olores de cada tipo de animal estímulo, sin embargo esta conducta puede ser revertida mediante el tratamiento con propionato testosterona (Agmo, 2003; Bakker et al., 1996; Carr et al., 1965; Gottreich et al., 2000; Paredes et al., 1998). Si los machos no están sexualmente motivados para preferir a las hembras en estro y no son capaces de identificar sus olores estos no inician las conductas precopulatorias y por lo tanto tampoco la cópula.

Se han realizado una gran variedad de estudios para determinar si la testosterona o el estradiol generado por su metabolismo, están involucrados en la activación de la conducta copulatoria, la preferencia sexual y la preferencia olfatoria. La testosterona se biotransforma a través de dos vías metabólicas: la  $5\alpha$ -reducción genera la  $5\alpha$ -dihidrotestosterona y la aromatización genera estradiol. A continuación se describen los estudios que evalúan el papel de la  $5\alpha$ -dihidrotestosterona y el estradiol en el control de la conducta sexual masculina.

## **2.1 Andrógenos**

Los andrógenos constituyen la señal que inicia la diferenciación de los ductos de Wolff en el epidídimo, los conductos deferentes y las vesículas seminales e induce la formación del escroto y del pene (George, 1997; Veyssiere et al., 1982). En el animal

adulto los andrógenos tienen efectos sobre la musculatura, el hueso, la hematopoyesis, la coagulación y el metabolismo de lípidos, proteínas y carbohidratos (revisión en Bhasin, 1998).

La testosterona puede metabolizarse mediante la enzima 5- $\alpha$  reductasa a 5- $\alpha$  dihidrotestosterona. La enzima 5 $\alpha$ -reductasa es una proteína integral de membrana que se localiza en el retículo endoplásmico y en la membrana nuclear externa, utiliza como cofactor al dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato para catalizar la reducción irreversible de la testosterona a la 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona (revisión en Hiipaka y Liao, 1998). La 5 $\alpha$ -reducción ocurre en los tejidos blanco periféricos tales como la piel de los testículos, la próstata, el epidídimo y las vesículas seminales (Hiipaka y Liao, 1998). La reducción de la testosterona se lleva a cabo durante todas las fases del desarrollo y en prácticamente todas las estructuras cerebrales de una gran variedad de especies de vertebrados (revisión en Celotti et al., 1992). La 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona se ha considerado como el metabolito activo de la testosterona en la mayor parte de los tejidos periféricos sensibles a andrógenos, ambas hormonas se unen a los receptores a andrógenos, pero la 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona tiene aproximadamente 5 veces más afinidad por el receptor que la testosterona (Wilbert et al., 1983).

Deficiencias en la actividad de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa inducen una forma de pseudohermafroditismo en los machos, en los cuales, los niveles de testosterona son adecuados para el desarrollo del epidídimo, vasos deferentes y vesículas seminales a partir de los ductos de Wolf, pero no son suficientes para la virilización de los senos urogenitales y tubérculos genitales.

En la edad adulta, si las ratas macho son gonadectomizadas y tratadas con 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona, se observa que esta hormona no es capaz de estimular la conducta sexual, e induce sólo una ligera preferencia sexual por las hembras en estro (Vega Matuszczyk y Larsson, 1994).

## 2.2 Estrógenos

El estradiol (sintetizado a partir de la testosterona, mediante la enzima aromatasa) restablece la conducta copulatoria en ratas macho gonadectomizadas, induce la expresión de montas e intromisiones y un número reducido de patrones de eyaculación (McGinnis y Dreifuss, 1989; Putnam et al., 2003; Roselli et al., 2001). El tratamiento combinado de benzoato de estradiol y  $5\alpha$ -dihidrotestosterona restaura la conducta sexual masculina al mismo nivel que en las ratas macho gonadalmente intactas (Feder et al., 1974) o gonadectomizadas y tratadas con benzoato de testosterona (Baum y Vreeburg, 1973).

En general se ha propuesto que el estradiol actúa sobre el sistema nervioso central promoviendo la conducta sexual, mientras que la  $5\alpha$ -dihidrotestosterona restablece la sensibilidad táctil del pene a los niveles de precastración. Sin embargo se ha reportado que la  $5\alpha$ -dihidrotestosterona también actúa sobre el sistema nervioso central. De esta forma, Lodder y Baum (1977) reportaron que la  $5\alpha$ -dihidrotestosterona estimula la conducta de monta en ratas macho castradas por un largo período y tratadas con benzoato de estradiol después de la transección bilateral del nervio pudendo. Lo que sugiere que la  $5\alpha$ -dihidrotestosterona y el estradiol actúan sinérgicamente en el cerebro de la rata para activar la conducta de monta.

El papel del estradiol en el control de la conducta sexual masculina también se ha estudiado por medio de técnicas que involucren la eliminación de los genes que codifican para sus receptores. Por ejemplo, se ha demostrado que existen dos tipos de receptores a estrógenos el  $\alpha$  y el  $\beta$ , el estradiol se une a ambos receptores con una afinidad similar (Kuiper et al., 1997). En ratones en los que se ha eliminado el gen que codifica para los receptores a estrógenos tipo  $\alpha$ , se han descrito varias deficiencias conductuales, estos animales no emiten vocalizaciones ultrasónicas, las cuales son señales que tienden a excitar sexualmente al animal emisor y a la pareja sexual (Ogawa y cols., 2000). Así mismo, estos machos pasan menos tiempo con las hembras en estro en comparación con los machos control (Rissman et al., 1997) y no prefieren a las hembras en estro con respecto a las hembras en anestro (Wersinger et al., 1997). Estas diferencias conductuales pueden deberse a que estas ratas investigan por periodos muy cortos la región anogenital de las hembras y

de los machos (Wersinger y Rissman, 2000). En cuanto a la ejecución de la conducta sexual masculina, los machos deficientes en el gen para los receptores a estrógenos  $\alpha$  no eyaculan, únicamente entre el 0-12.5% intrometen y del 0-40% montan a las hembras en estro (Rissman et al., 1999). Los machos a los que se les induce la eyaculación, mediante tratamientos con testosterona y dopamina no son fértiles ya que su número de espermatozoides es reducido y la motilidad de estos es deficiente (Rissman et al., 1997). Por otra parte, los ratones sin el gen para los receptores a estrógenos  $\beta$ , los machos copulan y dejan descendencia (Scordalakes et al., 2002). Ya que los receptores a estrógenos  $\beta$  forman homodímeros y heterodímeros con los receptores tipo  $\alpha$ , es posible que estos dímeros tengan funciones desconocidas. Por lo tanto no se puede descartar la participación de los receptores a estrógenos tipo  $\beta$  en la modulación de la conducta sexual masculina.

### **2.3 Aromatasa**

Se ha propuesto que la diferenciación sexual del cerebro es resultado de la aromatización de la testosterona a estradiol (Baum, 1979; MacLusky y Naftolin, 1981; MacLusky et al., 1985; McEwen et al., 1977). Esta idea ha generado la hipótesis de aromatización la cual propone que la testosterona secretada por los testículos, durante la vida fetal y al nacimiento del animal, es transformada a estradiol mediante la aromatización. Este proceso masculiniza el cerebro en desarrollo.

Los niveles de actividad de la enzima aromatasa difieren en ambos sexos. (Negri-Cesi et al., 2001; Roselli y Klosterman, 1998; Tobet et al., 1985; Tsuruo et al., 1994; Vaney et al., 2000) encontrándose más elevados en los machos que en las hembras durante los estadios pre y post natal (estadios que se caracterizan por los altos niveles de testosterona en los machos). La aromatización de los esteroides estrogénicos a partir de andrógenos es mediada por la enzima P450 aromatasa la cual forma un complejo con la flavoproteína dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato reducido-citocromo P450 reductasa, ambas enzimas se localizan en el retículo endoplásmico. La enzima aromatasa está codificada en el gen CYP19 (gen con 17 exones), el cual puede ser transcrito desde cualquiera de sus 5 primeros exones alternativos no traducidos, lo que permite que sea regulado de manera específica en las diferentes estructuras. De esta forma, la enzima se

produce en diferentes tejidos como son: la placenta, el cerebro, el ovario, el hueso y el tejido adiposo, bajo diferentes controles de regulación (Kamat et al., 2002; Mellon y Vaudry, 2001; Miller y Chousos, 2001). La aromatización se realiza mediante dos reacciones que hidroxilan el grupo metilo del carbono 19 de la testosterona y una tercera hidroxilación en el carbono 2, resultando en la pérdida del carbono 19 y la consecuente aromatización del anillo A del esteroide, durante este proceso se liberan 3 moléculas de agua. Esta serie de reacciones requiere de 3 pares de electrones donados por 3 moléculas del dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato reducido (Mellon y Vaudry, 2001; Miller y Chousos, 2001).

La importancia de la aromatización en la diferenciación sexual y control de la conducta sexual masculina y femenina ha sido estudiada ampliamente ya sea administrando fármacos que inhiben la actividad de la enzima aromatasa o analizando la conducta de los animales a los cuales se les ha eliminado el gen que codifica para dicha enzima. Cuando se administra neonatalmente un inhibidor de la aromatasa como el 1,4,6-androstratriene-3,17-dione en ratas macho, se incrementa la capacidad de los machos para ejecutar conductas sexuales femeninas (Bakker et al., 1996; Brand y col, 1991; Davis et al., 1979; Domínguez et al., 2002; McEwen et al., 1977; Vreeburg et al., 1977). Además, las ratas macho tratadas neonatalmente con 1,4,6-androstratriene-3,17-dione presentan una secreción cíclica de gonadotropinas, tienen una menor preferencia por las hembras en estro en comparación con los machos controles y sus patrones de eyaculación están alterados (Brand et al., 1991; Vreeburg et al., 1983).

Los ratones adultos sin el gen de la enzima aromatasa, tienen un incremento en el peso de sus vesículas seminales y de vejiga/próstata (Fisher et al., 1998). Conductualmente estos ratones montan un menor número de veces y la latencia de monta es más larga que en los animales control (tipo silvestre; Bakker et al., 2002; Honda et al., 1998). El 42% de los ratones sin el gen para la aromatasa no copulan, por lo tanto su fertilidad es muy baja ya que aproximadamente el 23% son fértiles comparados con una fertilidad de un 90% de los ratones silvestres (Matsumoto et al., 2003). Aunque los machos deficientes en el gen de la aromatasa se aproximan a las hembras en estro, lamen y huelen sus genitales (Honda et al., 1998) no tienen preferencia sexual por ellas ni por sus olores (Bakker et al., 2002). La

enzima aromatasa se ha detectado en las principales áreas neuronales involucradas en el control de la conducta sexual masculina como son: el área preóptica media, el área preóptica periventricular, el núcleo de la cama de la estría terminal, el núcleo ventromedial del hipotálamo y la amígdala corticomedia (Roselli et al., 1985).

En conjunto estos estudios demuestran que la conversión por medio de la enzima aromatasa de la testosterona a estradiol es de suma importancia en la diferenciación sexual cerebral, ya que esta hace posible que las conductas sexuales típicas de cada sexo se puedan presentar normalmente en la edad adulta.

#### **2.4 Receptores a andrógenos y estrógenos**

Tanto la testosterona como el estradiol actúan de manera diferente en cada sexo, por ejemplo los tratamientos con testosterona en hembras y machos gonadectomizados inducen más fácilmente la conducta sexual masculina en los machos que en las hembras. Lo anterior puede deberse a diferencias en la concentración y distribución de los receptores a andrógenos y estrógenos en el cerebro. De esta manera se ha demostrado que el número de receptores a andrógenos y estrógenos son sexualmente dimórficos. Los machos tienen un mayor número de receptores a andrógenos en comparación a las hembras, en el núcleo de la cama de la estría terminal, el área preóptica media, y el septum lateral (Lu et al., 1998).

Las hormonas regulan la expresión de los genes de sus neuronas blanco. De esta manera, los receptores pueden actuar como factores de transcripción activados por su ligando. Cuando la hormona se une a su receptor en las células blanco, alteran el tipo y la cantidad de ácido ribonucleico mensajero (Rories y Spelsberg, 1989; Spelsberg et al., 1989). En el sistema nervioso central la activación de los receptores puede modificar la expresión de genes que codifican para neurotransmisores, neuropéptidos, receptores a neurotransmisores y enzimas que biosintetizan a los neurotransmisores (Harlan, 1988). Además las hormonas esteroideas pueden regular la expresión de genes que codifican para su propio receptor o para otros receptores a esteroides.

Por ejemplo en el cerebro de la rata, el ratón y la zarigüeya los receptores a andrógenos disminuyen o son indetectables después de 1 a 4 días de la gonadectomía. Mientras que los tratamientos con propionato de testosterona o dihidrotestosterona,

restauran en un lapso de 15 min a 24 horas el número de sus receptores (Lu et al., 1999; Wood y Newman, 1993). Esta regulación positiva de los andrógenos por su receptor se puede dar a dos niveles: estabilizándolo o incrementando la síntesis de proteínas para nuevos receptores (Kemppainen y Wilson, 1996). La regulación positiva de los receptores a andrógenos también se observa mediante la administración de estradiol, ya que en los machos tratados con esta hormona, se han detectado incrementos en la concentración de los receptores a andrógenos y la duración de la unión ligando-receptor aumenta (Handa et al., 1987; Roselli y Fasasi, 1992). En cuanto a los receptores a estrógenos, estos son regulados negativamente por los andrógenos y el estradiol (Poulin et al., 1989; Simerly y Young, 1991). Estos datos demuestran que existe una interacción entre ambos esteroides y por lo tanto la conducta sexual masculina es modulada por la interacción entre andrógenos y estrógenos.

En la rata macho, la cópula incrementa la actividad neuronal (cuantificada mediante la expresión de genes de respuesta temprana como es c-fos) del área preóptica media, el núcleo de la cama de la estria terminal, el núcleo dorso medial de la amígdala y el campo central tegmental. Se ha reportado que aproximadamente el 100% de estas células son inmunopositivas para receptores a andrógenos, aunque el 76% de las células positivas a receptores a andrógenos no colocalizan con la proteína del gen c-fos (proteína Fos). Mientras que, aproximadamente el 29% de las neuronas positivas a Fos colocalizan con células positivas a receptores a estrógenos (Gréco et al., 1998). Lo anterior indica que durante la cópula las neuronas que se activan son principalmente aquellas que también expresan receptores a esteroides lo cual nuevamente demuestra la importancia de estas hormonas en el control de la conducta sexual masculina.

En mi tesis de maestría demostramos que los machos no-copuladores no tienen una preferencia por las hembras en estro, por lo que resulta interesante investigar en el presente trabajo si dicha conducta se debe a que los machos no-copuladores no sean capaces de discriminar entre el olor de los machos, las hembras en estro o en anestro. Como ya se mencionó para que los machos prefieran a las hembras en estro y sus olores es necesario que sus niveles hormonales de andrógenos y/o estrógenos sean normales. Ya que los machos no-copuladores no prefieren a las hembras en estro es probable que esta conductua

se deba a bajos niveles de testosterona o estradiol. Además, los macho no-copuladores al igual que una alta proporción de ratones sin el gen que codifica para los receptores a andrógenos, estrógenos tipo  $\alpha$  y ratones sin la actividad de la enzima aromatasa, tienen alteraciones en la ejecución de la conducta sexual masculina y no prefieren a las hembras en estro. Así en el presente estudio evaluaré si los machos no- copuladores presentan alteraciones en el número de receptores a andrógenos y estrógenos así como en la actividad de la enzima aromatasa en las estructuras neuronales más importantes en el control de la conducta sexual masculina.

### **Capítulo 3. Control neuronal de la conducta sexual masculina**

Las diversas especies de mamíferos emplean preferentemente algunos de sus sentidos para poder detectar y elegir a su pareja sexual. Los roedores utilizan con este fin principalmente al sentido del olfato. Los olores sexualmente relevantes o feromonas, se liberan en la saliva, las secreciones glandulares de la piel y la orina (revisión en Kashiwayanagi, 2002), estas moléculas pueden ser de naturaleza proteica, lipídica o derivados de esteroides gonadales (Singer, 1991). Mediante las feromonas el organismo puede obtener información de la identidad, el sexo, el estado hormonal y social del animal emisor.

La mayoría de los mamíferos poseen dos sistemas olfatorios, el principal y el accesorio o vomeronasal. En 1975 Scalia y Winans propusieron que cada sistema está especializado en distintas funciones ya que ambos tienen patrones de conectividad diferente. Además se propuso que cada sistema responde a un tipo diferente de olor. En general se ha sugerido que el sistema olfatorio principal detecta olores volátiles provenientes entre otras fuentes de la comida o depredadores potenciales (Firestein, 2001). La detección de estos olores se lleva a cabo ya sea pasivamente mediante la respiración o activamente mediante el husmeo. Mientras que el sistema vomeronasal, se ha involucrado principalmente en detectar y procesar estímulos no volátiles mediante el órgano vomeronasal, el cual constituye una bomba activa de dilatación-compresión que requiere del contacto nasal directo con la fuente de feromonas (Luo y col, 2003). Sin embargo, recientemente se ha encontrado evidencias de que esta división funcional no es tan clara ya que se ha propuesto que el sistema olfatorio principal también puede estar involucrado en el procesamiento de las feromonas (Revisión en Bakker, 2003). En la rata se ha considerado que el sistema vomeronasal es el más involucrado en la detección de las feromonas. Las estructuras que conforman este sistema son muy importantes en el control neuronal de la conducta sexual masculina, por lo que a continuación se describirán ampliamente.

### 3.1 Descripción del sistema de proyección vomeronasal

El sistema de proyección vomeronasal está involucrado en diferentes funciones reproductivas que incluyen la inducción y el mantenimiento de la conducta sexual masculina (revisión en: Hull et al., 2002; Portillo y Paredes, 1998), los mecanismos feromonales primarios que afectan a la gestación (Halpern, 1987; Bellringer et al., 1980) el ciclo estral (Ingersoll, 1981, Jemiolo et al., 1986) y la conducta materna (Fleming et al., 1979).

En los roedores, los olores sexualmente relevantes son detectados en los receptores del órgano vomeronasal, el cual a su vez transmite la información hacia el bulbo olfatorio accesorio. En el bulbo olfatorio accesorio se pueden identificar dos capas, la mitral y la granular. Las células mitrales son inervadas por los nervios del órgano vomeronasal (Guillamon y Segovia, 1997) mientras que las granulares controlan la actividad de las mitrales mediante sinapsis recíprocas que modulan o reafinan las señales (revisión en Ichikawa). Las células mitrales del bulbo olfatorio accesorio proyectan a los núcleos anteromedial y posterocortical de la amígdala y a el núcleo de la cama de la estría terminal (Canteras et al., 1995; De Olmos et al., 1978; Kondo, 1992; Scalia y Winans, 1975; Shipley y Adamck, 1984). Los núcleos anteromedial y posterocortical de la amígdala tienen proyecciones a otros núcleos de las cuales, las más importantes son las establecidas con el núcleo amigdaloides posterior y el área preóptica media (Shiosaka et al., 1983). Finalmente en el área preóptica media se integran la información olfatoria, visual y auditiva, lo cual genera la señal necesaria para ejecutar la cópula (Figura 3).

El sistema de proyección vomeronasal es sexualmente dimórfico (De Vries y Simerly, 2002; Segovia et al., 1993; Segovia et al., 1996). Este dimorfismo depende de los efectos organizacionales de los esteroides gonadales durante el periodo postnatal (Segovia y Guillamon, 1982). En la edad adulta es necesario que los animales estén gonadalmente intactos para mantener dicho dimorfismo (Cooke y col, 2003; De Vries y Simerly, 2002).

Varias líneas de investigación han demostrado la importancia de las diferentes estructuras que componen este sistema en el control de la conducta sexual masculina. A

continuación describiré brevemente la importancia de cada estructura del sistema de proyección vomeronasal en el control de la conducta sexual masculina.

a) Órgano vomeronasal

El órgano vomeronasal es una estructura quimiorreceptora fusiforme que se encuentra bilateralmente localizado en la parte más ventral del septum nasal. Es regulado desde el nacimiento por los esteroides gonadales y el mantenimiento de su morfología depende de la secreción de hormonas durante la edad adulta (Segovia y Guillamón, 1982). La interacción de las feromonas con el epitelio neurosensorial vomeronasal modifica la secreción de hormonas esteroides, las cuales influyen en la pubertad, el ciclo estral, la gestación, la conducta materna, la conducta sexual masculina y la femenina (Fleming et al., 1979; Kolunie y Stern, 1995; Saito y Moltz, 1986, Romero et al., 1990) y parece estar relacionado con la inhibición del cuidado paterno en las ratas macho (Menella y Moltz, 1988).

La importancia del órgano vomeronasal en el control de la conducta sexual masculina se ha estudiado mediante técnicas de lesión. De esta forma, en estudios en los que se remueve el órgano vomeronasal a ratas macho sexualmente expertas se observa un incremento en la latencia de la primera intromisión, así como una disminución en la tasa de intromisiones. Fuera de estas alteraciones, todos los machos que han copulado son capaces de eyacular (Kondo, 2003; Saito y Moltz, 1986). Tampoco se han observado alteraciones en las erecciones sin contacto, las cuales son inducidas por los olores de las hembras sexualmente receptivas y se ha propuesto que son detectados por el sistema olfatorio principal (Kondo y col, 1990;1999). Por otra parte, los ratones genéticamente privados de la función del órgano vomeronasal, mediante una mutación nula en el gen del receptor tipo 2, un canal catiónico que aparentemente se expresa sólo en el órgano vomeronasal, se ha demostrado que los machos homocigotos en esta mutación copulan normalmente (Stowers, 2002). Sin embargo, estos animales montan con igual frecuencia tanto a los machos como a las hembras (Leypold et al., 2002; Stowers, 2002). Los machos emiten vocalizaciones ultrasónicas en respuesta a la presencia de las hembras receptivas y estas vocalizaciones se

suprimen cuando se encuentra otro macho adulto. Los machos sin el gen del receptor tipo 2 emiten vocalizaciones ultrasónicas en presencia de hembras como de machos, lo que sugiere que los machos con alteraciones funcionales en el órgano vomeronasal no distinguen a las hembras de los machos con base en sus diferencias en su olor, aspecto y emisión de sonidos.

La lesión del órgano vomeronasal también modifica la actividad de las estructuras con las que se conecta. Por ejemplo mediante la detección de la actividad de genes de respuesta temprana (gen c-fos como índice de actividad neuronal) se ha demostrado que la remoción del órgano vomeronasal disminuye los niveles basales así como la respuesta de Fos inducido por la cópula en la capa granular del bulbo olfatorio y en la amígdala media (Kondo et al., 2003). No solamente se han observado cambios conductuales al lesionar el órgano vomeronasal, también se ha reportado una disminución de los efectos estimulantes de los machos en la liberación de la hormona luteinizante (Rajendren, 1990), pero no en los niveles de testosterona (Stowers, 2002).

#### b) Bulbo olfatorio accesorio

Es una estructura que se localiza en la porción dorsocaudal del bulbo olfatorio principal (Paxinos, 1995). Recibe las señales olfatorias mediante el nervio vomeronasal (nervio terminal, par craneal 0; Fuller y Burger, 1990) y tiene proyecciones directas a la amígdala media, específicamente a los núcleos cortical medial y posterior, al núcleo de la cama de la estría terminal y al núcleo del tracto olfatorio accesorio. El desarrollo del bulbo olfatorio accesorio depende de los esteroides gonadales (Roos et al., 1988) es significativamente más grande en la rata macho que en la hembra. Pero si el macho es gonadectomizado en etapas tempranas del desarrollo, genera un bulbo olfatorio accesorio de tamaño similar al de la hembra (Segovia y Guillamon, 1996).

El bulbo olfatorio accesorio está involucrado en diferentes funciones como son la agresión (Guillot y Chapouthier, 1998; Koluine y Stern, 1995; Stock et al., 2001), la regulación de la temperatura (Kikusui et al., 2001), el aprendizaje y la memoria olfativa (Guan et al., 1993; Taylor y Keverne, 1991), la conducta materna (Brouette-Lahlou et al., 1999) y en la conducta sexual masculina (Meisel et al., 1982).

En los primeros trabajos en los cuales se lesionaron los bulbos olfatorios se observaron déficits conductuales, que fueron atribuidos únicamente a la anosmia. En la actualidad se ha reportado que los bulbos olfatorios tienen importantes funciones integrativas, además de su rol olfativo (Cain, 1974). La remoción quirúrgica de los bulbos olfatorios en la rata macho genera una reducción en el porcentaje de animales que eyaculan (Larsson, 1975; Meisel et al., 1982). Este déficit es generado porque algunos machos no inician la cópula (Larsson 1969; Meisel et al., 1980) o no la mantienen (Meisel et al., 1980). Por otro lado, los tratamientos con propionato de testosterona no revierten los efectos de la bulbectomía, sugiriendo que el daño en la cópula no es una consecuencia secundaria de la disminución de estímulos gonadales (Meisel et al., 1980). Así mismo, la lesión de los bulbos también afectan la preferencia sexual ya que se ha demostrado que mientras los machos prefieren a las hembras en estro y copulan con ellas, los animales con lesiones en los bulbos olfatorios y en el área preóptica media no copulan y no prefieren a las hembra en estro, ya que pasan el mismo tiempo con las hembras en estro, las hembras en anestro y en el compartimiento neutral (Edwards et al., 1990; Edwards et al., 1996). Resultados más consistentes y dramáticos en la pérdida de la conducta sexual se observan con lesiones bilaterales conjuntas del bulbo olfatorio principal y del accesorio, ya que esta manipulación elimina por completo la cópula (Meredith et al., 1980; Winans y Powers, 1977).

Los efectos de la bulbectomía en la ejecución de la conducta sexual masculina y la preferencia sexual pueden deberse a: un deterioro severo para oler, lo cual se refleja en un déficit en la capacidad del macho para hacer clasificaciones dependientes del olor de sus coespecíficos como posibles parejas sexuales, ya que las neuronas del bulbo olfatorio accesorio responden selectivamente a los animales estímulo en combinaciones específicas de cepa y sexo (Kumar et al., 1999; Luo et al., 2003). Otra posibilidad es que los efectos conductuales de la bulbectomía indiquen una inhibición en la entrada de información neuronal hacia el cerebro anterior y por lo tanto los efectos conductuales no dependan del deterioro sensorial que se presenta, sino de un déficit en la integración de la información a nivel central (Edwards et al., 1990).

### c) Amígdala

La amígdala es un complejo nuclear que se continúa con la cola del núcleo caudado, localizándose en la porción medial del lóbulo temporal. Esta estructura se ha involucrado en una gran variedad de conductas y funciones reguladoras, como son las emociones, la memoria, la modulación de los sistemas autónomos y neuroendocrinos, la reproducción y la agresión (Barros y col 2003; Domínguez et al., 2001; Paxinos, 1995; Wintink et al., 2003). La amígdala es más grande en los machos que en las hembras (Hines et al., 1992; Guillamón y Segovia, 1996) este dimorfismo se establece por las hormonas gonadales ya que cuando los machos son gonadectomizados el tamaño de este núcleo disminuye adquiriendo un tamaño similar al de las hembras (Cooke et al., 1999). Estos efectos pueden ser revertidos mediante el reemplazo hormonal de testosterona o sus metabolitos (Cooke et al., 2003).

La amígdala recibe información sensorial desde los bulbos olfatorios y del órgano vomeronasal, la procesa y la releva al área preóptica media y otras estructuras (Wood, 1997). El papel de la amígdala en el control de la cópula en roedores ha sido estudiado mediante la lesión de los núcleos cortico-mediales y los núcleos basolaterales. Las lesiones en la amígdala basolateral no disminuyen la expresión de la conducta copulatoria en ratas macho (Harris y Sachs, 1975, Kondo, 1992) y en el hámster (Lehman y Winans, 1982). Incluso en la rata los machos con lesiones bilaterales en esta estructura tienen latencias de monta e intervalos entre intromisiones más cortas que los animales falsos lesionados (Harris y Sachs, 1975). Por otra parte, las lesiones de la amígdala cortico-medial, reducen la conducta sexual en las ratas (de Jonge et al., 1992, Domínguez 2001, Kondo, 1992), los hámster (Lehman y col, 1980) y los gerbos (Heeb y Yahr, 2000). Las alteraciones conductuales que producen estas lesiones incluyen: un aumento en la latencia de monta y eyaculación e incrementos en los intervalos inter-intromisiones. Además, los machos realizan un mayor número de intromisiones antes de eyacular y este patrón es presentado un número menor de veces antes de llegar a la fatiga sexual que en los machos control. Se ha postulado que las lesiones en la amígdala medial disminuyen las erecciones sin contacto, pero no alteran el funcionamiento del pene, ya que en los machos con lesiones en

la amígdala es posible inducirles erecciones mediante la estimulación táctil (Kondo et al., 1997; Kondo y Sachs 2002).

La importancia de la amígdala en el control de la conducta sexual masculina se ha corroborado en los experimentos de implantes de hormonas. Implantes bilaterales de testosterona en la amígdala media de las ratas macho gonadectomizadas retrasan la desaparición de la cópula y de las erecciones sin contacto (Bialy y Sachs, 2000). La administración de 5  $\alpha$ -dihidrotestosterona en la amígdala media es suficiente para activar la conducta sexual en las ratas gonadectomizadas a las cuales se les ha administrado sistémicamente estradiol en dosis bajas (Baum et al., 1982).

#### d) Núcleo de la cama de la estría terminal

El núcleo de la cama de la estría terminal es considerado un regulador integral del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Dong et al., 2001; George y Aston-Jones 2002) está involucrado en la regulación de aspectos fisiológicos y conductuales de la reproducción. El núcleo de la cama de la estría terminal es una estructura sexualmente dimórfica siendo más grande en el macho que en la hembra (Guillamón y Segovia, 1996; Guillamón et al., 1988; Hines et al., 1992), establece conexiones recíprocas con la amígdala medial y el área preóptica media (Canteras et al., 1992; Wood, 1997). La importancia de este núcleo sobre la regulación de la conducta sexual masculina se ha estudiado lesionando la estructura. Ratas macho lesionadas en el núcleo de la cama de la estría terminal y en la estría terminal incrementan su número de montas e intromisiones necesarias para eyacular así como el intervalo entre las intromisiones y las latencias de eyaculación (Claro et al., 1995; Emery y Sachs, 1976; Giantonio et al., 1970; Liu et al., 1997). Sin embargo el número de erecciones no se modifica aunque si disminuyen las erecciones sin contacto (Liu et al., 1997).

Los efectos de las lesiones en el núcleo de la cama de la estría terminal son muy similares a los generados por las lesiones en la amígdala cortico medial, lo cual sugiere que la función principal del núcleo de la cama de la estría terminal es el relevo de información desde la amígdala a otras áreas como el área preóptica media (Benjamín et al., 1982).

El núcleo de la cama de la estría terminal y la amígdala cortico medial están principalmente involucrados en el mantenimiento de la conducta copulatoria y en la

ejecución de la eyaculación. Aparentemente también integran las vías neuronales que controlan parcialmente la iniciación de la conducta de cópula y su reinicio después de una eyaculación (Emery y Sachs, 1976).

#### e) Área preóptica media

El área preóptica media se localiza entre la porción caudal del quiasma óptico y la comisura anterior, tiene como borde rostral y caudal a la lámina terminal y a la división media del núcleo de la cama de la estría terminal respectivamente. El área preóptica media se conecta con varias regiones neuronales. Se han identificado aferentes y eferentes entre el área preóptica media y el septum lateral, el núcleo de la cama de la estría terminal, la amígdala medial, varios núcleos hipotalámicos (incluidos el lateral, paraventricular, ventromedial y arcuato), el giro central, los núcleos del rafe (dorsal y medio), el área ventral tegmental y el núcleo del tracto solitario (Chiba y Murata, 1985; Conrad y Pfaff, 1976; Simerly et al., 1986; Simerly y Swanson, 1988). Otras eferentes importantes del área preóptica media llegan a todas las regiones de la zona periventricular del hipotálamo, núcleo accumbens, caudado-putamen, pálido ventral y el núcleo tegmental dorsolateral.

Debido a que el área preóptica media forma diversas conexiones neuronales con una gran cantidad de regiones del cerebro, se ha implicado en diversas funciones como: la regulación endocrina de la gonadotropina hipofisiaria (revisión en De Vries, 2002), la liberación de prolactina (Watanobe, 2001; Pi X, 1999), la termorregulación (Ray et al., 2001; Boden et al., 2000), la conducta materna (Olazábal et al., 2002; Stack et al., 2002) y sexual (revisión en Hull et al., 2002; Paredes y Baum, 1997; Portillo y Paredes, 1998). En el control de la conducta sexual masculina se encuentran involucradas vías aferentes al área preóptica media desde el órgano vomeronasal, las cuales transportan información quimiosensorial via el bulbo olfatorio accesorio, la amígdala cortico medial y la porción encapsulada del núcleo de la cama de la estría terminal (Scalia y Winans, 1975). Varias líneas de investigación han demostrado la importancia que tiene el área preóptica media en el control de la conducta sexual masculina. Estas investigaciones incluyen estudios de lesión, estimulación eléctrica e implante ya sea de hormonas, neurotransmisores o tejido fetal. A continuación describiré los estudios que demuestran por qué se considera al área

preóptica media como la estructura más importante en el control de la conducta sexual masculina.

Como ya he descrito, las lesiones de diferentes regiones del cerebro pueden alterar en diverso grado la conducta sexual masculina. Sin embargo, los efectos más consistentes y dramáticos sobre la supresión de esta conducta se observan cuando se destruye el área preóptica media. Los primeros estudios de lesiones en esta estructura fueron realizados por Brookhart y Dey (1941), Hillarp y colaboradores (1954) y Soulairac y Soulairac (1956). En estos trabajos fue evidente que la conducta sexual masculina se elimina por completo cuando se realizan lesiones grandes en el área preóptica media, mientras que si son pequeñas, la conducta sexual sólo se modifica o se elimina temporalmente (Heimer y Larsson, 1966/1967). Además, es necesario que las lesiones sean bilaterales, ya que la destrucción preóptica unilateral sólo produce cambios transitorios (Lisk, 1968).

Esta inhibición de la conducta sexual después de lesionar el área preóptica media se observa en todas las especies de animales hasta el momento estudiadas incluidas: pollos, ranas, ratones, hámster, rata, cabra, gato, perro, hurón, lagartijas, víboras, peces, marmotas y mono rhesus (para revisión Hull et al., 2002; Paredes y Baum 1997). La inhibición de la conducta copulatoria, no produce alteraciones del eje hipófisis-gónada ya que no se han detectado cambios en los niveles plasmáticos de testosterona, ni en el peso de los testículos y vesículas seminales (Stefanick y Davidson, 1987, Hurtazo y Paredes datos no publicados). Tampoco se han encontrado alteraciones en los mecanismos de crección o eyaculación (Heimer y Larsson, 1966/1967; Lisk, 1968; Lupo et al., 1983; Stefanick y Davidson, 1987). Se han realizado varios trabajos con la finalidad de inducir la conducta sexual masculina en los machos lesionados en el área preóptica media. Los tratamientos crónicos con propionato de testosterona o los procedimientos que inducen conducta sexual en ratas macho sexualmente poco activas (manipulación del macho, reemplazo de la hembra, choques eléctricos al macho) no son capaces de restablecer la conducta sexual (Caggiula et al., 1974; Heimer y Larsson, 1966/1967; Lupo et al., 1983; Stefanick y Davidson, 1987). Más aún, machos lesionados en el área preóptica media no copulan aun después de ocho meses posteriores a la lesión (Ginton y Merari, 1977). Estas observaciones indican que los déficits en la conducta sexual producidos por lesiones en está estructura son permanentes.

La recuperación de la conducta sexual en los machos lesionados en el área preóptica media sólo se ha observado usando dos estrategias. Hansen y colaboradores (1982) inyectando lisuride intraperitonealmente (agonista no específico del receptor de las monoaminas) observaron que el 50% de los animales lesionados en el área preóptica media eyacularon. Mientras que al inyectarles solamente el vehículo (solución salina), los sujetos no copulan. Es interesante mencionar que Hansen y colaboradores (1982) administran el lisuride diez días después de la lesión, mientras que en otros trabajos al ser administrado a las 15 semanas posteriores a la lesión, los machos no recuperan la conducta sexual masculina (Paredes et al., 1993). Lo anterior demuestra que los efectos sobre la conducta sexual masculina del lisuride dependen de en que momento se les administra a los animales.

En la segunda estrategia Paredes y colaboradores (1990) transplantaron tejido fetal hipotalámico (transplante homotípico) a ratas macho lesionadas en el área preóptica media, con esta técnica todos los animales recuperaron la conducta sexual. Los machos que recibieron el transplante recuperan gradual y permanentemente la conducta sexual (la cual persiste aún después de 8 meses del transplante). En un estudio posterior (Paredes et al., 1993) inyectaron fluorogold (marcador retrógrado) en el tegmento dorsolateral para evaluar la conectividad entre el tejido huésped y el transplante. En esos experimentos encontraron proyecciones de células del transplante marcadas en la región hipotalámica, lo cual indica que el tejido huésped efectivamente establece conexiones con el transplante.

Aunque existen una gran cantidad de experimentos que indican que las neuronas del área preóptica media tienen un papel muy importante en la regulación de la conducta sexual masculina, no existe un consenso de cuales son los mecanismos por los que las lesiones en el área preóptica media alteran esta conducta. En la actualidad se postula que el área preóptica media controla tanto los aspectos consumatorios como los motivacionales de la conducta sexual masculina.

Las evidencias aquí descritas demuestran claramente la importancia de diferentes estructuras cerebrales en el control de la conducta sexual masculina en la rata macho. En la figura 3, se muestra un circuito funcional tentativo basado en los estudios ya descritos que permite suponer que en el macho las señales emitidas por una hembra en estro activan

principalmente al bulbo olfatorio accesorio, el núcleo de la cama de la estría terminal y la amígdala. Estas estructuras a su vez activan al área preóptica media, la cual desencadena los mecanismos motivacionales que incluyen: la orientación, la preferencia y la persecución de la hembra. El área preóptica media, por medio de sus conexiones con el tegmento dorso lateral, traduce la motivación sexual en ejecución de la conducta lo que permite al macho desplegar los patrones de monta intromisión y eyaculación.

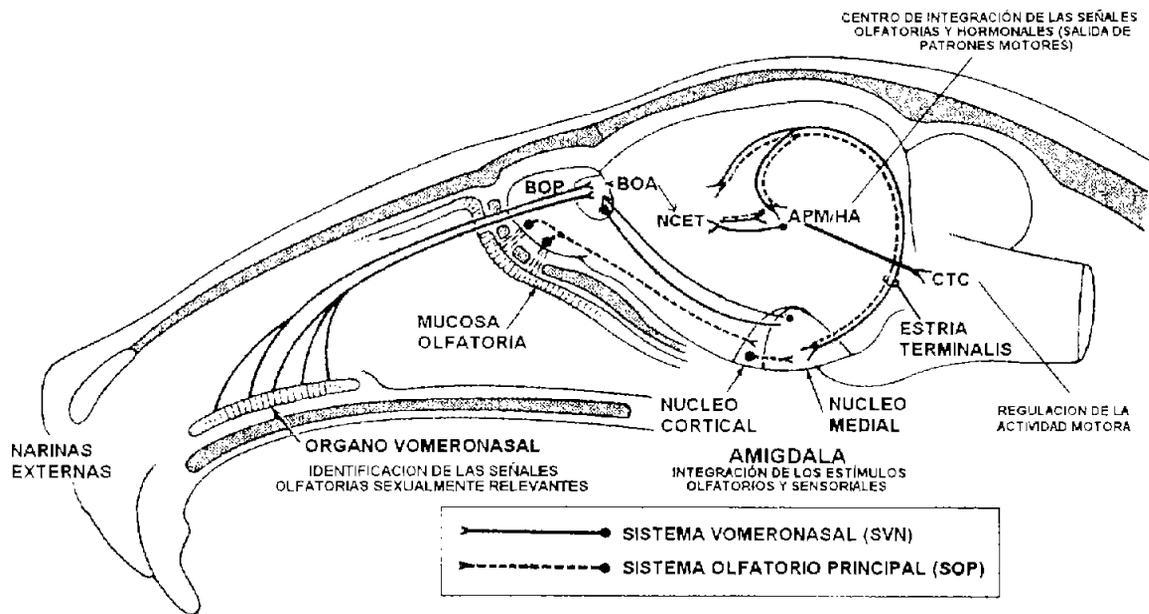


Figura 3.- El Sistema de proyección vomeronasal es un circuito neuronal que controla la conducta sexual de la rata macho. Inicia con la detección de estímulos sexualmente relevantes por el órgano vomeronasal, el cual transmite esta información al bulbo olfatorio accesorio (BOA). El BOA establece conexiones directas con la amígdala y el núcleo de la cama de la estria terminal (NCET), permitiendo que el macho detecte a una hembra en estro. La amígdala y el núcleo de la cama de la estria terminal establecen conexiones con el área preóptica media-hipotálamo anterior (APM/HA). En esta estructura se generan las conductas apetitivas de orientación, persecución a la hembra, así como de preferencia y reforzamiento sexual. El APM/HA establece conexiones con el campo tegmental central (CTC), permitiendo que el macho despliegue los patrones motores ejecutorios de la conducta sexual. Modificado de Baum 1992.

### 3.2 El sistema de proyección vomeronasal y Fos

La detección de las feromonas por el sistema de proyección vomeronasal involucra cambios en la actividad neuronal de sus diferentes componentes, estos pueden cuantificarse mediante la detección de genes de respuesta temprana. Entre los genes de respuesta temprana se ha identificado la familia de Fos, la cual cuenta con varios miembros como son: c-Fos, FosB, Fra-1 y Fra2 (Greenberg y ZIF, 1984; Nishina et al., 1990; Zerial et al., 1989). La proteína Fos se utiliza como un marcador de actividad neuronal en respuesta a una gran variedad de estímulos homeostáticos o sensoriales (Bullit, 1990; Ceccatelli et al., 1989; Herrera y Robertson, 1996; Kovács, 1998). El gen que codifica esta proteína se activa rápidamente en respuesta a la liberación de neurotransmisores o drogas que estimulan la entrada de adenosin 3'5' monofosfato cíclico o de  $Ca^{2+}$ . Ambos procesos fosforilan a la proteína de respuesta a adenosin 3'5' monofosfato cíclico/ $Ca^{2+}$ . Aunque también el gen que codifica a Fos puede ser inducido por la vía de Ras/proteína activada por cinasas mitógenas las cuales se activan mediante factores de transcripción (revisión en Kovács, 1998). La proteína Fos forma homodímeros o heterodímeros con miembros de la familia Jun (Morgan y Curran, 1991; Sheng y Greenberg, 1990) de tal manera que el heterodímero c-fos/c-jun activa la expresión de sus genes blanco, mientras que c-fos/JunB principalmente los inhibe (Sheng y Greenberg, 1990). Los dímeros se unen específicamente al ácido desoxirribonucleico en el sitio de la proteína-1, la cual regula la expresión de varios genes relacionados con el crecimiento, la reparación y replicación del genoma (Morgan y Curran, 1991; Sheng y Greenberg, 1990). El ácido ribonucleico mensajero de la proteína Fos se puede detectar a los 5 min posteriores a la estimulación, mientras que la expresión de la proteína después de 90 min (revisión en Smith et al., 1993).

En nuestro laboratorio y en muchos grupos de investigación se ha utilizado la detección de la proteína Fos, para evaluar la participación de las estructuras involucradas en el procesamiento de diferentes tipos de señales sensoriales. En estos trabajos se ha observado que el patrón de expresión de Fos es específico al tipo de estímulo aplicado. Por ejemplo, en experimentos donde se inyectan ratas con una solución hipertónica y se sacrifican después de 30 min se han localizado células inmunorreactivas a Fos en el órgano

subfornical (estructura circunventricular del cerebro involucrada en la regulación de los fluidos del cuerpo) (Giovannelli y Bloom, 1992). De manera similar, en estudios de hipertermia, se ha observado que después del estímulo hay una gran cantidad de neuronas inmunorreactivas a Fos en regiones cerebrales implicadas con este estímulo y no en otras áreas (Scammell et al., 1993). Lo que demuestra que la actividad neuronal cuantificada mediante la detección de Fos, depende del tipo de estímulo aplicado. Por lo tanto, su detección indica qué regiones están involucradas en el procesamiento neuronal de un determinado estímulo. En nuestro grupo de trabajo hemos utilizado la inducción de la proteína Fos para cuantificar la actividad de los circuitos neuronales involucrados en el control de la conducta sexual, como es el sistema de proyección vomeronasal de ratas macho y hembra en respuesta a varios tipos de estímulos sexualmente relevantes (revisión en Paredes y Baum, 1997). Experimentos en los que se ha utilizado la expresión de la proteína Fos, demuestran que la rata hembra tiene un patrón similar al de los machos en la respuesta a las feromonas de las hembras en estro (Bressler y Baum, 1996; Paredes y Baum, 1997). Por ejemplo Bressler y Baum (1996), demostraron que las ratas machos y hembras gonadectomizadas y tratadas con propionato de testosterona mostraron altos niveles de conducta sexual masculina (las hembras incluso desplegaron un patrón parecido al de eyaculación, sin expulsión de semen). En estos animales se cuantificó la actividad neuronal después de que los animales fueron expuestos a olores de hembras en estro. En estos experimentos, se observó un incremento significativo, similar (cuantitativamente y en términos de localización regional) entre los machos y las hembras, en el número de células inmunorreactivas a Fos a lo largo del circuito de proyección vomeronasal. Por otro lado, el procesamiento neuronal de las feromonas derivadas de machos sexualmente activos fue diferente en ambos sexos. En el bulbo olfatorio accesorio y amígdala machos y hembras mostraron una respuesta similar, pero a nivel del núcleo de la cama de la estría terminal y área preóptica media las células inmunorreactivas a Fos fueron significativamente más numerosas en las hembras que en los machos (Bakker et al., 1996). Esto sugiere que no existen diferencias significativas entre los machos y las hembras en el procesamiento de claves olfatorias provenientes de hembras en estro, pero sí en el procesamiento de los olores de los machos sexualmente activos.

Estos estudios demuestran la utilidad de la detección de la proteína Fos para identificar cómo se procesan las claves quimiosensoriales sexualmente relevantes en el sistema de proyección vomeronasal. En este trabajo utilizamos esta técnica para evaluar el procesamiento de los olores sexualmente relevantes en los machos no-copuladores.

## Capítulo 4.- Machos no-copuladores

Como se mencionó en los capítulos anteriores para que los machos copulen es necesario que los niveles hormonales de testosterona y estradiol sean normales y se requiere de la integridad neuronal de las estructuras que conforman al sistema de proyección vomeronasal en especial del área preóptica media. De esta manera, la ejecución de la conducta sexual masculina resulta de la integración de factores fisiológicos, hormonales neuronales y motivaciones. Aunque la conducta sexual masculina es ejecutada por la mayoría de los machos en todas las especies de mamíferos. En la cabra, el conejillo de Indias, el gerbo, el hámster y el ratón se han identificado sujetos que no copulan a pesar de tener libre acceso a las hembras en estro, estos se han denominado machos no-copuladores. Este tipo de animales han sido poco estudiados, por lo que aún se desconocen las causas de su déficit conductual. A continuación describiré los estudios realizados en los machos no-copuladores de cada una de estas especies.

### 4.1 Cabra

Los machos cabríos se pueden clasificar con base en su ejecución en pruebas de conducta sexual masculina como: 1) machos sexualmente eficientes o copuladores, los cuales al estar en contacto con hembras sexualmente receptivas las montan por lo menos 10 veces o tienen 6 eyaculaciones en un período de 30 min. 2) machos sexualmente deficientes (sujetos que podemos denominar no-copuladores o sexualmente lentos) estos no montan o tienen latencias largas (más de 15 min) para investigar a la hembra y 3) machos orientados a machos; no montan a las hembras en estro y en pruebas de preferencia sexual montan a otros machos (Perkins et al., 1992). Los machos sexualmente deficientes representan aproximadamente el 16-20% de la población (Alexander et al., 1999). Se ha propuesto que la causa de estas diferencias conductuales entre los machos cabríos se deben a alteraciones hormonales. Alexander y colaboradores (1999) midieron los niveles sanguíneos de testosterona y la hormona luteinizante, pero no encontraron diferencias en estas hormonas entre los diferentes grupos. Sin embargo, cuando los machos copuladores cohabitan con las

hembras sexualmente receptoras incrementan sus niveles de la hormona luteinizante, estos cambios no se observan en los machos sexualmente deficientes ni en los orientados a machos. En cuanto a los receptores a esteroides gonadales, se ha reportado que los machos copuladores tienen un menor número de receptores a estrógenos ocupados en el área preóptica media y un mayor número en la adenohipófisis anterior que los machos copuladores (Alexander et al., 1993). Morfológicamente se ha reportado que las estructuras sexualmente dimórficas como son: el área preóptica media y la amígdala difieren en densidad y tamaño celular entre los machos copuladores y sexualmente deficientes y que estos parámetros son similares entre los machos sexualmente deficientes y las hembras. Lo anterior demuestra que los machos sexualmente deficientes están neuroanatómicamente feminizados en estas áreas, lo cual podría influir en su conducta (Alexander et al., 2001).

#### **4.2 Gerbo**

En esta especie se ha demostrado que la conducta sexual masculina en los machos está directamente relacionada con los niveles sanguíneos de testosterona. En los adultos los niveles de esta hormona dependen de su ubicación intrauterina. Aquellos machos que en el útero se gestaron entre dos hembras, al alcanzar la edad adulta tienen aproximadamente la mitad de los niveles de testosterona, que los machos gestados entre animales de su mismo sexo (Clark et al., 1992). De los machos gestados entre dos hembras, el 22% no muestran interés por las hembras en celo, no las montan, no intrometen, ni eyaculan. Por consiguiente cuando cohabitan con ellas no las preñan (machos no-copuladores). Aunque los machos gestados entre dos hembras no copulan, despliegan más conductas parentales que los machos copuladores, pasan más tiempo anidando, cuidando y transportando a los recién nacidos (Clark et al., 2000).

#### **4.3 Conejillo de Indias, hámster y ratón.**

En el conejillo de indias, el hámster y el ratón se ha estudiado muy poco a los machos no-copuladores hasta el momento solamente se ha demostrado que el déficit en la

conducta sexual en estas especies no se debe a alteraciones en los niveles plasmáticos de testosterona, aunque no se ha investigado la participación de otras hormonas ni factores que pudieran estar participando (Harding y Feder, 1976).

#### **4.4 Rata**

Esta es la especie donde más se han estudiado a los machos no-copuladores. Se ha demostrado que estas ratas aunque no copulan, sí muestran un interés por las hembras sexualmente receptivas ya que están suficientemente motivados como para cruzar una reja electrificada para tener acceso a ellas (Stone et al., 1935). Además, en nuestro laboratorio hemos observado que los machos no-copuladores persiguen a las hembras en estro, exploran sus genitales e incluso ejecutan montas mal orientadas. Esto permite suponer que el déficit conductual en estos machos no se debe a alteraciones motivacionales. A nivel fisiológico se ha demostrado que los machos no-copuladores no tienen alteraciones en los mecanismos que controlan la erección, los movimientos penéanos y la eyaculación (Stefanick y Davidson, 1987). En cuanto a los aspectos hormonales, Damassa y colaboradores (1977) cuantificaron los niveles sanguíneos de testosterona en los machos no-copuladores, y reportaron que estos son similares a los encontrados en los machos copuladores. Aún más, si los machos no-copuladores son gonadectomizados y tratados con dosis supra fisiológicas de propionato de testosterona se induce la conducta sexual masculina sólo parcialmente (Damassa et al., 1977; Portilló y Paredes, 2003; Whalen et al., 1961). Es probable que los tratamientos con testosterona no induzcan la conducta sexual masculina en los machos no-copuladores debido a alteraciones en el número de receptores a esteroides gonadales, aunque esta posibilidad no ha sido evaluada, se ha reportado que los machos con baja actividad sexual (machos "dud"), tienen bajos niveles de receptores a estrógenos en el área preóptica media en comparación con los machos copuladores (Clark et al., 1985). Por lo que es muy probable que los machos no-copuladores también presenten una disminución de los receptores a estrógenos. En los aspectos neuronales, se ha demostrado que el área preóptica media es la región más importante en el control de la conducta sexual masculina. Si se estimula eléctricamente esta estructura en la rata macho,

se observa una facilitación de la conducta sexual masculina, durante o inmediatamente después de la estimulación (Malsbury, 1971; Merari y Ginton, 1975). De la misma manera, la estimulación eléctrica mediante el procedimiento de kindling (procedimiento de plasticidad neuronal en el cual la estimulación eléctrica del cerebro produce una modificación a largo plazo de la función neuronal) en el área preóptica media de machos previamente no-copuladores se induce la conducta sexual masculina en este tipo de ratas (Paredes et al., 1990). Estos cambios conductuales son específicos a la estimulación en esta área ya que el kindling en otras regiones como la amígdala no induce la conducta sexual masculina en machos no-copuladores (Paredes et al., 1990). Además, la inducción de esta conducta es a largo plazo, pues aún después de 8 meses de la estimulación los machos previamente no-copuladores siguen copulando (Portillo et al., 2003). Aunque no es claro el mecanismo por medio del cual el kindling induce la conducta sexual masculina en los machos no-copuladores, nosotros hemos propuesto que la reducción en el umbral de la posdescarga es acompañada por una reducción en el umbral de la cópula, el cual puede ser definido como el nivel de actividad neuronal en el área preóptica media necesarios para la activación de la conducta sexual masculina. Estos datos apoyan nuestra hipótesis de que los machos no-copuladores tienen alguna alteración funcional a nivel del área preóptica media. Otra evidencia a favor de esta idea proviene de los trabajos de Rhees y colaboradores (1999), quienes midieron el volumen del núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica media (macho > hembra) de machos no-copuladores y copuladores, encontrando que el volumen de este núcleo es significativamente menor en los machos no-copuladores con respecto a los machos control, e igual al de las hembras. Otra estructura que estudiaron fue el núcleo anteroventral periventricular (hembra > macho), el volumen de esta estructura fue mayor en los machos no-copuladores que en los copuladores. Lo que sugiere los machos no-copuladores son sujetos neuronalmente feminizados en estas estructuras.

El hecho de que existan machos no-copuladores en las diferentes especies de mamíferos sugiere que este déficit conductual no es exclusivo o un artefacto en la rata macho. En el futuro resultará interesante comparar si las alteraciones hasta el momento encontradas en las diferentes especies son comunes, ya que esto nos hablaría de

mecanismos del control de la conducta sexual masculina comunes para todos los  
maníferos.

## Hipótesis

**Hipótesis.-** Los machos no-copuladores tienen una alteración funcional en el área preóptica media.

## Objetivos

**Objetivo 1.-** Caracterizar conductualmente a los machos no-copuladores.

- a) Pruebas de coordinación motora fina.
- b) Pruebas de preferencia de lugar condicionada.
- c) Pruebas de conducta sexual femenina
- d) Pruebas de capacidad olfatoria.
- e) Pruebas de preferencia olfatoria.

**Objetivos 2.-** Determinar si existen diferencias funcionales en el área preóptica media de ratas macho copuladoras y no-copuladoras.

- a) Cuantificar la actividad neuronal del área preóptica media y del resto de las estructuras del sistema de proyección vomeronasal durante el procesamiento de olores sexualmente relevantes utilizando la técnica de Fos.
- b) Evaluar el número de receptores a andrógenos y estrógenos en el área preóptica media y las demás estructuras que conforman al sistema de proyección vomeronasal.
- c) Cuantificar la actividad de la enzima aromatasa en el área preóptica media, el núcleo de la cama de la estría terminal, el hipotálamo anterior, el núcleo ventro medial del hipotálamo y la amígdala.

## **Capítulo 5. Método general**

### **Sujetos**

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con pesos entre 250-350 grs y hembras de 200-300 grs de peso. Los animales fueron mantenidos en un ciclo invertido de luz-oscuridad (12:12 h), con libre acceso a comida comercial para rata (LabDiet, 5001 dicta para roedores) y agua purificada. Para mantener sexualmente receptivas a las hembras estas fueron ovariectomizadas bilateralmente y se inyectaron con 25µg de benzoato de estradiol 53-55 horas antes del tratamiento con 1mg de progesterona de 4-6 horas antes de las pruebas conductuales. Las hormonas fueron disueltas en aceite de maíz comercial e inyectados subcutáneamente en un volumen de 0.2 ml.

### **Grupos**

Las ratas machos, con base en cuatro pruebas de conducta sexual masculina con hembras en estro, fueron clasificadas en: 1) machos copuladores, aquellos sujetos que montaron, intromitieron y eyacularon en las cuatro pruebas. 2) machos no-copuladores, aquellos que no ejecutaron ningún patrón de conducta sexual masculina en el mismo número de pruebas.

### **Pruebas de conducta sexual masculina**

Las pruebas de conducta sexual fueron realizadas entre la tercera y la séptima hora del período de oscuridad bajo una luz roja tenue (foco de 25 watts). Se utilizaron cajas de observación rectangulares (40X60X40 cm) con frentes de vidrio y con tapa de malla de alambre en donde el animal experimental fue introducido una vez que la hembra estímulo fue colocada (5 min antes de la prueba). En estas pruebas se registraron el número de montas e intromisiones anteriores a la eyaculación. Las prueba de conducta sexual masculina se dieron por terminadas después de que la rata macho cumplió con el primer

intervalo post-eyaculatorio (tiempo desde la eyaculación hasta la primera intromisión de la siguiente serie copulatoria) o si no montó o intromitió en un período de 30 minutos.

## **5.2 Experimento 1. Coordinación motora fina y preferencia de lugar condicionada en las ratas macho no-copuladoras.**

### **a) Antecedentes**

Para el despliegue de la conducta sexual masculina es necesario que los machos coordinen adecuadamente sus movimientos finos y sean capaces de buscar y perseguir a la pareja sexual. Posteriormente requieren coordinar sus movimientos para montar, intrometer y eyacular a las hembras en estro. Agmo y colaboradores (1987) demostraron que la administración en machos sexualmente expertos de agonistas para el receptor a GABA<sub>B</sub>, como el baclofen (2.5 mg/kg), inhiben la expresión de la conducta precopulatoria como copulatoria, las ratas con este tratamiento no disminuyen su actividad ambulatoria. Sin embargo, cuando las ratas tratadas con baclofen son colocadas en el Smart Rod (aparato que evalúa la habilidad del sujeto para caminar, Whishaw et al., 2003) no pueden coordinar los movimientos de sus cuatro miembros y se caen del cilindro. Por lo que la incapacidad para copular en los machos tratados con baclofen, al menos en parte se debe a que estos machos no coordinan sus movimientos finos, pero no se debe a una severa discapacidad para moverse.

Agmo (1999) ha propuesto que el objetivo de la ejecución de la conducta sexual no es la reproducción. Por ejemplo, ratas y gatos no tienen ningún conocimiento implícito o explícito de las consecuencias de la conducta sexual. El macho probablemente nunca vuelve a ver a la hembra después de copular y si este encuentro se da es posible que la reconozca y si la reconoce no asocia su previa actividad sexual con la causa de su preñez. Los machos copulan porque esta conducta es reforzante por sí misma, desde este punto de vista la conducta sexual puede estudiarse y entenderse como parte de otras conductas que son ejecutadas por su valor afectivo positivo independientemente de sus consecuencias (Agmo, 1999). De esta forma podemos entender a la conducta sexual como un reforzador de manera similar a los reforzadores primarios clásicos como son la comida o los líquidos.

Las pruebas de preferencia de lugar condicionada son comúnmente utilizadas para determinar las propiedades reforzantes de una droga (Bardo et al., 1995; Mueller et al., 2002; Russo et al., 2003), un reforzador primario (Agmo et al., 1993), o conducta sexual (Agmo y Gómez, 1993; García y Paredes, 2004; Paredes y Alonso, 1997). En estas se evalúa si el animal es capaz de asociar un estado afectivo positivo (reforzante) con un determinado ambiente. De esta manera utilizando esta prueba se ha determinado que la cópula y la ingesta de agua pueden emplearse como reforzadores en la rata (Agmo et al., 1993; Paredes y Alonso, 1997). Además se ha demostrado que los efectos reforzantes de estas conductas son mediados por los péptidos opioides (Agmo et al., 1993; Agmo y Paredes, 1988). Por ejemplo, en la conducta sexual masculina el estado reforzante inducido por la eyaculación puede ser bloqueado por la administración de antagonistas a opioides como la naloxona sin alterar la ejecución de la conducta sexual. De la misma manera, se ha demostrado que la administración de morfina (opioide sintético) induce una preferencia de lugar condicionada similar a la observada por la eyaculación (Agmo y Berenfeld, 1990). En los machos no-copuladores desconocemos si estos animales no copulan debido a que las conductas reforzantes no sean capaces de inducirles estados afectivos positivos.

La hipótesis predice que los machos no-copuladores coordinan adecuadamente sus movimientos y su sistema general de reforzamiento es normal.

El objetivo fue por un lado evaluar si los machos no-copuladores tienen alteraciones en su coordinación motora fina que les impidan iniciar y ejecutar la conducta sexual masculina, por lo que se realizaron pruebas de coordinación motora utilizando el aparato Smart Road. Otro objetivo fue evaluar si en los machos no-copuladores es posible inducir un estado afectivo positivo el cual sea de suficiente intensidad para asociarlo con las claves ambientales de la caja de preferencia de lugar condicionada. En este experimento se utilizó como reforzador la administración de morfina. Para propósitos de comparación se agregó en estos experimentos un grupo de machos sin experiencia sexual.

## **b) Método**

### **Pruebas de coordinación motora fina**

En el registro de la actividad motora fina se usó el aparato Smart Rod (AccuScan Instruments Inc). Este consiste de un cilindro separado de la superficie, el cual se programa para girar a una determinada velocidad por un tiempo establecido. Las pruebas exigen que las ratas coordinen sus movimientos finos para no caer del cilindro. Se registra el tiempo de permanencia en el cilindro y la velocidad a la cual giraba el rodillo en el momento en que el animal se cayó. Para iniciar el experimento los animales fueron entrenados durante nueve ocasiones, el criterio utilizado fue que al menos el 90% de los machos copuladores y sin experiencia sexual no se cayeran al final del entrenamiento. Posteriormente se realizó la prueba que fue de una mayor duración y dificultad (tabla 1).

Tabla 1.- Metodología utilizada en las pruebas de coordinación motora fina

Entrenamiento:

Duración (seg)	Velocidad (rpm)
5	5
10	10
15	15
10	10
5	5
5	0

Prueba:

Duración (seg)	Velocidad (rpm)
10	5
20	10
30	15
30	-15
20	10
10	5
5	0

### **Pruebas de preferencia de lugar condicionada**

Estas pruebas se realizaron en cajas de madera de tres compartimentos, los laterales difirieron entre sí en: el color, el olor y la textura. Los experimentos de preferencia de lugar condicionada constaron de 8 sesiones (una diaria). En la sesión 1, preprueba, la rata fue colocada en el centro de la caja y se registró el tiempo de permanencia en los compartimentos laterales. Al compartimiento con mayor tiempo de permanencia se le denominó caja no reforzada. En las sesiones 2, 4 y 6 todos los sujetos se inyectaron con 1ml/kg de solución salina intraperitoneal (sustancia utilizada como vehículo) y fueron colocados en la caja no reforzada por 30 min, en las sesiones 3, 5 y 7 un grupo de machos copuladores y no-copuladores se inyectaron intraperitonealmente con morfina disuelta en solución salina (1mg/kg). En estas sesiones los animales se colocaron en el compartimiento en el que permanecieron menos tiempo durante la preprueba (caja reforzada). El grupo control se inyectó siempre con solución salina. Durante estas sesiones se pretendió que los machos asociaran el estado afectivo positivo inducido por la morfina con las características ambientales de la caja. En la sesión 8, prueba, se registró el tiempo de permanencia en la caja reforzada y la no reforzada, como en la preprueba. Se utilizaron dos criterios para evaluar si la morfina induce un condicionamiento de preferencia de lugar. El tiempo en el compartimiento reforzado y el índice de preferencia (tiempo en la caja reforzada / tiempo en la caja reforzada + el tiempo en la caja no reforzada), deben incrementar entre la preprueba y la prueba. Para considerar que se indujo preferencia de lugar condicionada es necesario que ambos parámetros entre la preprueba y la prueba sean estadísticamente diferentes,  $p < 0.05$  (Agmo y Gómez, 1993).

### **c) Análisis estadístico**

En las pruebas de coordinación motora fina, los datos no tuvieron una distribución normal y por lo tanto fueron analizados mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Los datos obtenidos de las pruebas de preferencia de lugar condicionada tuvieron una distribución normal por lo que fueron analizadas mediante un análisis de varianza 4 X 2 (grupo X sesión), con medidas repetidas en el último factor. En caso de diferencias significativas se utilizó la prueba de la diferencia mínima significativa de Fisher.

### **d) Resultados**

Con base en las pruebas de conducta sexual masculina se obtuvieron los siguientes grupos: machos copuladores aquellos que eyacularon en cuatro pruebas con hembras en estro (n = 10). Machos no-copuladores los cuales no desplegaron ningún patrón de conducta en el mismo número de pruebas (n = 10) y un grupo de machos sin experiencia sexual aquellos sujetos que no tuvieron ningún contacto físico con las hembras en estro (n = 10).

#### **Pruebas de coordinación motora fina**

En estas pruebas registramos el tiempo de permanencia en el cilindro y la velocidad a la cual giraba el rodillo en el momento en que las ratas se caen. Al inicio de la prueba los animales fueron entrenados durante nueve sesiones hasta que el 90% de los machos copuladores no se cayeron del rodillo. Durante esta fase de entrenamiento no encontramos diferencias entre los grupos (datos no mostrados). En la prueba, tampoco encontramos diferencias entre los grupos en el tiempo de permanencia en el rodillo (pruebas K-W:  $\chi^2_{(2)} = 0.03$ , p = 0.98), ni en la velocidad de giro del rodillo en el momento en que los animales se caen (pruebas K-W:  $\chi^2_{(2)} = 1.32$ , p = 0.51) (Tabla 2).

Tabla 2.- Tiempo de permanencia en el cilindro y velocidad de giro del rodillo al momento en que las ratas se caen del Smart Rod. Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar y el número de sujetos se muestra entre los paréntesis. No se encuentran diferencias significativas entre los grupos en ninguno de los parámetros registrados. Los datos fueron analizados mediante una prueba Kruskal Wallis.

	Tiempo de permanencia en el cilindro (seg)	Velocidad de giro del rodillo al momento en que rata se cayó (rpm)
Sin experiencia (n = 10)	105 $\pm$ 7	10 $\pm$ 1
Copulador (n = 10)	98 $\pm$ 10	12 $\pm$ 1
No copulador (n = 10)	105 $\pm$ 6	10 $\pm$ 1

### Pruebas de preferencia de lugar condicionada

En estos experimentos encontramos un efecto significativo de la interacción grupo por sesión ( $F_{(3,36)} = 6.21$ ,  $p = 0.002$ ), pero no del tiempo en el compartimiento reforzado entre la preprueba y la prueba en el factor grupo ( $F_{(3,36)} = 1.78$ ,  $p = 0.168$ ) y sesión ( $F_{(1,36)} = 3.18$ ,  $p = 0.08$ ). Las pruebas *post hoc* demostraron que los machos sin experiencia sexual, copuladores y no-copuladores tratados con morfina incrementaron el tiempo de permanencia en la caja reforzada entre la preprueba y la prueba,  $p < 0.05$  (Figura 4). En los machos control (sujetos tratados únicamente con solución salina) el tiempo en el compartimiento reforzado entre la preprueba y prueba disminuyó significativamente.

En el índice de preferencia encontramos un efecto significativo de la interacción grupo por sesión ( $F_{(3,36)} = 10.32$ ,  $p = 0.0001$ ), en el factor grupo ( $F_{(3,36)} = 4.78$ ,  $p = 0.007$ ) y en la sesión ( $F_{(1,36)} = 75.04$ ,  $p = 0.0001$ ). Las pruebas de efectos principales simples demostraron que en los machos sin experiencia sexual, copuladores y no-copuladores el índice de preferencia incremento entre la preprueba y la prueba,  $p < 0.01$ . En el grupo control no se observaron diferencias significativas.

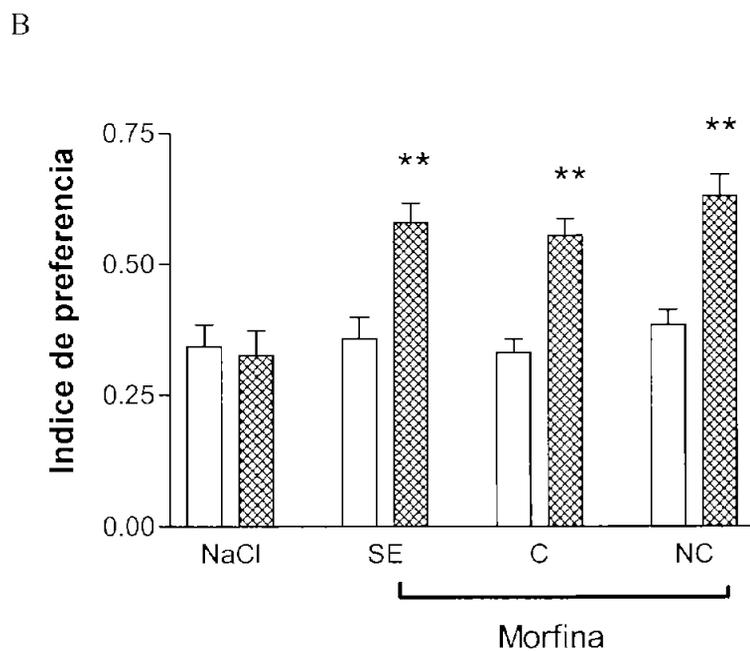
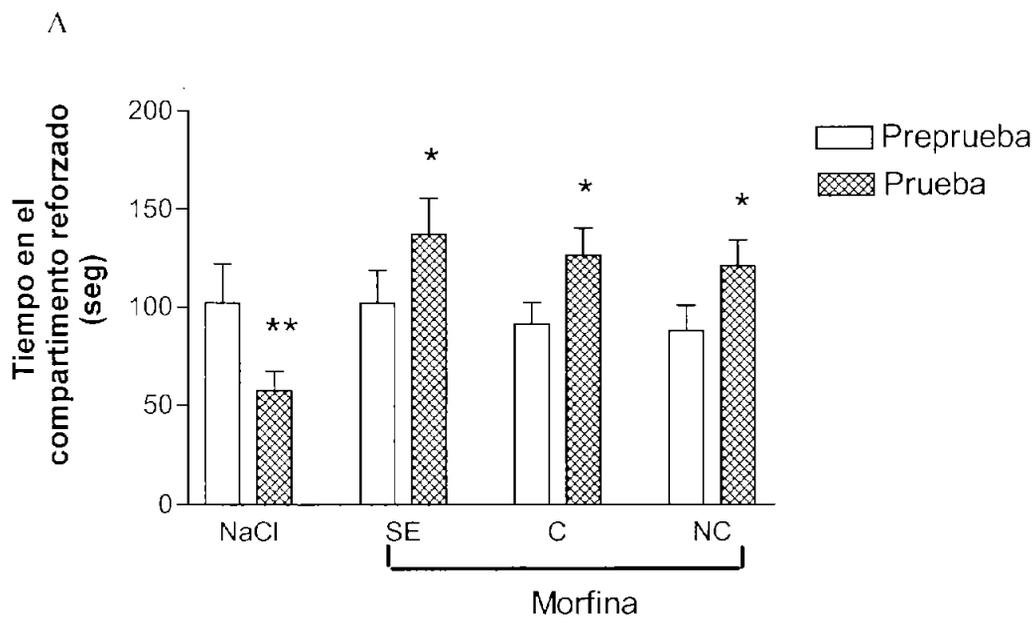


Figura 4.- Pruebas de preferencia de lugar condicionada en machos: control (NaCl; n = 10), sin experiencia sexual (SE; n = 10), copuladores (C; n = 10) y no-copuladores (NC; n = 10). Se muestran los datos obtenidos en el tiempo en el compartimento reforzado (A) y el índice de preferencia (B). Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar y fueron analizados mediante un análisis de varianza.

Diferente de la preprueba en el mismo grupo. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

## **e) Conclusiones**

Los datos demuestran que los machos no-copuladores no tienen alteraciones en la coordinación motora fina de sus movimientos. Lo que sugiere que el déficit conductual en estos animales no se debe a que no sean capaces de coordinar adecuadamente sus movimientos para perseguir e iniciar la cópula con las hembras en estro.

En las pruebas de preferencia de lugar condicionada encontramos que en los machos no-copuladores al igual que los copuladores y sin experiencia sexual, la administración de morfina indujo un estado afectivo positivo de suficiente intensidad que fue asociado con las características ambientales de la caja de preferencia de lugar condicionada. Estos resultados sugieren que en los machos no-copuladores, su sistema general de reforzamiento mediado por opioides no se encuentra alterado, ya que es posible inducirles estados afectivos positivos. Por lo que podemos descartar que una de las causas de la ausencia de la conducta sexual en los machos no-copuladores sea que las conductas reforzantes como la cópula no se lleven a cabo debido a que en estos animales no sea posible inducir estados afectivos positivos.

## **5.3 Experimento 2. Conducta sexual femenina en ratas macho no-copuladoras.**

### **a) Antecedentes**

Nuestra hipótesis general de trabajo fue que los machos no-copuladores tienen una alteración funcional a nivel del área preóptica media. Esta estructura no solamente controla la ejecución de la conducta sexual masculina en la rata macho sino que también se ha postulado que tiene un papel inhibitorio sobre la conducta sexual femenina. Los machos con lesiones electrolíticas y neurotóxicas en el área preóptica media incrementan la respuesta de lordosis cuando son gonadectomizados y tratados con benzoato de estradiol o benzoato de estradiol más progesterona (Hennessey et al., 1986; Kondo et al., 1990; Olster, 1993). Si los machos no-copuladores tuvieran algún déficit funcional en el área preóptica media, esta estructura no podría ejercer sus efectos inhibitorios sobre la respuesta de lordosis y por lo tanto se esperaría que en estos animales se facilitara la expresión de esta conducta.

La hipótesis fue que en los machos no-copuladores es más fácil inducir la respuesta de lordosis que en los machos copuladores.

El objetivo fue evaluar si los machos no-copuladores están conductualmente feminizados y si el tratamiento hormonal con benzoato de estradiol o benzoato de estradiol más progesterona facilita la ejecución de la conducta sexual femenina. Además, ya que en los roedores el olfato es el principal sentido para elegir una pareja sexual, también evaluamos si en los machos no-copuladores y copuladores en las diferentes condiciones hormonales prefieren los olores de las hembras en estro con respecto a los machos sexualmente activos.

## **b) Método**

Después de realizar las pruebas de conducta sexual masculina se seleccionó un grupo de machos copuladores ( $n = 8$ ) y otro de no-copuladores ( $n = 8$ ). Las pruebas de conducta sexual femenina y preferencia olfatoria fueron realizadas cuando los machos estuvieron en las siguientes condiciones hormonales: a) gonadalmente intactos, b) gonadectomizados y tratados con benzoato de estradiol ( $25\mu\text{g/rata}$ ) 52-56 horas antes de las pruebas y c) gonadectomizados tratados con benzoato de estradiol a la dosis anterior más progesterona ( $1\text{mg /rata}$ ) 4 a 6 horas antes de las pruebas. Adicionalmente con el propósito de comparación se agregó un grupo de hembras ovariectomizadas ( $n = 5$ ), las cuales recibieron los tratamientos b y c.

### **Pruebas de conducta sexual femenina**

En las pruebas de conducta sexual femenina cada sujeto experimental fue colocado en cajas de observación individuales en las cuales se encontraba un macho sexualmente activo. Se permitió que estos montaran un total de 10 veces a cada macho copulador y no-copulador, se registró la conducta de lordosis en respuesta a la monta. Esta conducta se evaluó con base a la escala propuesta por Hardy y Debold (1972), intensidad 0 si el animal no arquea el cuerpo y no levanta la cola, intensidad 1 si solamente se presentó un ligero arqueamiento y levantamiento de la cola e intensidad 2 si el arqueamiento y levantamiento de la cola es a la altura de la espalda (Figura 2). Los parámetros registrados fueron el coeficiente de lordosis (número total de respuestas de lordosis / número de montas + número de intromisiones) y la intensidad media de lordosis (suma de puntos por prueba / número de respuestas de lordosis).

### **Pruebas de preferencia olfatoria**

En estas pruebas, se cuantificó el tiempo que los animales pasaron oliendo / investigando olores sexualmente relevantes. Las pruebas se realizaron en cajas de madera diseñadas para observar la conducta sexual. Dentro de la caja se colocaron tres contenedores ( $12 \times 11 \times 5$  cm) distribuidos en las dos esquinas y el otro al centro. El orden

en que estos platos fueron presentados a cada rata fue aleatorio. Cada plato contenía uno de los siguientes tipos de aserrín:

1) Aserrín de hembras en estro: el cual fue expuesto a secreciones vaginales, orina y heces de hembras ovariectomizadas y tratadas con benzoato de estradiol y progesterona .

2) Aserrín de machos: este fue expuesto a orina y heces de machos sexualmente activos.

3) Aserrín limpio: aserrín sin ningún tipo de secreción ni desecho animal.

Durante la prueba el animal experimental se colocó al centro de la caja y se cronometró el tiempo que pasó investigando / oliendo cada uno de los platos. La prueba tuvo una duración total de 10 min. Las pruebas se realizaron por duplicado, para el análisis de los datos utilizamos el valor promedio (revisión en Bakker, 1996).

### **c) Análisis estadístico**

En el análisis de las diferencias en el coeficiente de lordosis y la intensidad media de lordosis se usaron pruebas de Kruskal Wallis seguida de la prueba U Mann-Whitney. En los experimentos de preferencia olfatoria se usó un análisis de varianza  $2 \times 3 \times 3$  (grupo X tipo de aserrín X condición hormonal) de medidas repetidas del último factor. En caso de diferencias significativas, se realizaron comparaciones post-hoc empleando la prueba de la diferencia mínima significativa de Fisher.

## d) Resultados

### Pruebas de conducta sexual femenina

En el coeficiente de lordosis (Tabla 3A), los machos no-copuladores no difieren de los machos copuladores ( $U = 30.5$ ,  $n_1 = 8$ ,  $n_2 = 8$ ,  $p = 0.87$ ) en la condición hormonal intacto. En la condición hormonal gonadectomizado y tratado con benzoato de estradiol se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos (pruebas K-W:  $\chi^2_{(2)} = 10.98$ ,  $p = 0.0041$ ), las pruebas *post hoc* revelaron que las hembras tienen un mayor coeficiente de lordosis que los machos copuladores y no-copuladores ( $U = 0$ ,  $n_1 = 5$ ,  $n_2 = 8$ ,  $p = 0.002$  y  $U = 0$ ,  $n_1 = 5$ ,  $n_2 = 8$ ,  $p = 0.003$  respectivamente). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los machos copuladores y no-copuladores ( $U = 28.5$ ,  $n_1 = 8$ ,  $n_2 = 8$ ,  $p = 0.71$ ). Cuando los animales fueron gonadectomizados y tratados con benzoato de estradiol más progesterona encontramos diferencias entre los grupos (pruebas K-W:  $\chi^2_{(2)} = 9.28$ ,  $p = 0.01$ ) las pruebas de U Mann-Whitney demuestran que las hembras tienen un coeficiente de lordosis más alto que los machos copuladores y no-copuladores ( $U = 5$ ,  $n_1 = 5$ ,  $n_2 = 8$ ,  $p = 0.02$  y  $U = 0$ ,  $n_1 = 5$ ,  $n_2 = 8$ ,  $p = 0.002$  respectivamente), tampoco en esta condición hormonal encontramos diferencias entre los machos copuladores y no-copuladores ( $U = 22.5$ ,  $n_1 = 8$ ,  $n_2 = 8$ ,  $p = 0.3$ ).

En cuanto a la intensidad de lordosis (Tabla 3B) en la condición gonadalmente intacto no encontramos diferencias entre los machos copuladores y no-copuladores ( $U = 30.5$ ,  $n_1 = 8$ ,  $n_2 = 8$ ,  $p = 0.87$ ). En la condición hormonal gonadectomizado y tratado con benzoato de estradiol encontramos diferencias entre los grupos (pruebas K-W:  $\chi^2_{(2)} = 10.92$ ,  $p = 0.004$ ), en las hembras la intensidad de lordosis fue mayor que en los machos copuladores y no-copuladores ( $U = 0$ ,  $n_1 = 5$ ,  $n_2 = 8$ ,  $p = 0.003$  y  $U = 0$ ,  $n_1 = 5$ ,  $n_2 = 8$ ,  $p = 0.003$  respectivamente), no se encontramos diferencias entre los machos copuladores y no-copuladores ( $U = 31$ ,  $n_1 = 8$ ,  $n_2 = 8$ ,  $p = 0.91$ ). Cuando las ratas fueron gonadectomizadas y tratadas con benzoato de estradiol más progesterona encontramos diferencias significativas entre los grupos (pruebas K-W:  $\chi^2_{(2)} = 10.95$ ,  $p = 0.004$ ). Las hembras tienen una mayor intensidad de lordosis que los machos copuladores y no-copuladores ( $U = 0$ ,  $n_1 = 5$ ,  $n_2 = 8$ ,

$p = 0.003$  y  $U = 0$ ,  $n_1 = 5$ ,  $n_2 = 8$ ,  $p = 0.003$ ), no se encontraron diferencias entre los machos copuladores y no-copuladores ( $U = 29.5$ ,  $n_1 = 8$ ,  $n_2 = 8$ ,  $p = 0.79$ ).

Esto resultados sugieren que el tratamiento hormonal es adecuado para inducir receptividad femenina, pero no potencia la expresión de esta conducta en los machos no-copuladores.

Tabla 3.- Conducta sexual femenina en machos copuladores (C) y no-copuladores (NC) en tres condiciones hormonales: intactos (INT), gonadectomizados tratados con benzoato de estradiol (GDX+BE) y gonadectomizados tratados con benzoato de estradiol más progesterona (GDX+BE+P). Se agregó un grupo de hembras ovariectomizadas en los tratamientos hormonales. Se muestra en A, el coeficiente de lordosis y en B, la intensidad media de lordosis. Los datos fueron analizados utilizando la prueba de Kruskal Wallis seguido de la prueba U Mann-Whitney y se expresan como la media  $\pm$  error estándar.

A.- Coeficiente de lordosis

Condición hormonal	Hembras (n = 5)	C (n = 8)	NC (n = 8)
Intacto	No probado	8 $\pm$ 4	9 $\pm$ 6
GDX+BE (25 $\mu$ g)	100 *	22 $\pm$ 7	25 $\pm$ 7
GDX+BE (25 $\mu$ g) + P (1mg)	100 *	87 $\pm$ 6	80 $\pm$ 8

B.- Intensidad de lordosis

Condición hormonal	Hembras	C	NC
Intacto	No probado	0.08 $\pm$ 0.04	0.09 $\pm$ 0.06
GDX+BE	1.9 $\pm$ 0.02 *	0.31 $\pm$ 0.1	0.34 $\pm$ 0.1
GDX+BE + P	2 *	1.4 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.2

Los datos fueron analizados utilizando la prueba de Kruskal Wallis seguido de la prueba U Mann-Whitney y se expresan como la media  $\pm$  error estándar.

Diferente de macho copulador y no copulador en la misma condición hormonal. \*  $p < 0.05$ .

**Preferencia olfatoria**

Paralelamente a las pruebas de conducta sexual femenina se realizaron pruebas de preferencia olfatoria entre aserrín limpio, impregnado con secreciones de hembras en estro y expuesto a secreciones de machos sexualmente activos durante las mismas condiciones hormonales. En estas pruebas encontramos diferencias en la interacción entre el tipo de olor

y condición hormonal ( $F_{(4,143)} = 6.89$ ,  $p < 0.0001$ ) y en el tipo de olor ( $F_{(2,143)} = 18.1$ ,  $p < 0.0001$ ) pero no encontramos diferencias en la interacción grupo por tipo de olor por condición hormonal ( $F_{(4,143)} = 2$ ,  $p = 0.1$ ), grupo por condición hormonal ( $F_{(2,143)} = 2.4$ ,  $p = 0.1$ ) y grupo por tipo de olor ( $F_{(2,143)} = 2.82$ ,  $p = 0.07$ ). Tampoco se encontraron diferencias significativas en el factor grupo ( $F_{(1,143)} = 1.25$ ,  $p = 0.27$ ), condición hormonal ( $F_{(2,143)} = 0.9$ ,  $p = 0.4$ ). Las pruebas *post hoc* demostraron que los machos copuladores y no-copuladores intactos tuvieron una clara preferencia por el aserrín expuesto a secreciones vaginales de hembras en estro en lugar del impregnado con secreciones de machos sexualmente activos y del aserrín limpio, aunque esta preferencia fue significativamente menor en los machos no-copuladores que en los copuladores (Tabla 4). Cuando los sujetos fueron gonadectomizados y tratados con benzoato de estradiol (grupo: GDX+BE) los machos copuladores y no-copuladores prefirieron el aserrín expuesto a hembras en estro solamente del limpio. Ninguna preferencia olfatoria por los diferentes tipos de olores se observó cuando los animales fueron tratados con benzoato de estradiol más progesterona (grupo: GDX+BE+P).

Tabla 4.- Pruebas de preferencia olfatoria entre aserrín limpio, aserrín expuesto a secreciones de machos sexualmente activos y aserrín expuesto a secreciones de hembras en estro. Los machos copuladores y no-copuladores fueron probados en las siguientes condiciones hormonales, intactos (INT), gonadectomizados y tratados con benzoato de estradiol (GDX+BE) y gonadectomizados tratados con benzoato de estradiol más progesterona (GDX+EB+P). Los datos se muestran en segundos y fueron analizados mediante un análisis de varianza y se expresan como la media  $\pm$  error estándar.

	Copulador (n = 8)			No copulador (n = 8)		
	Limpio	Macho	Hembra	Limpio	Macho	Hembra
INT	8 $\pm$ 1	15 $\pm$ 2	59 $\pm$ 13** $\Delta$	11 $\pm$ 1	15 = 2	29 $\pm$ 5* $\ominus$
GDX+BE	15 $\pm$ 2	23 $\pm$ 5	34 $\pm$ 8 $^{\circ}$	16 $\pm$ 3	25 = 4	29 $\pm$ 5 $^{\circ}$
GDX+BE+P	14 $\pm$ 2	21 $\pm$ 3	25 $\pm$ 5	16 $\pm$ 3	23 $\pm$ 4	23 $\pm$ 5

Diferente de macho y limpio en el mismo grupo. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01.

Diferente de macho copulador en la misma condición hormonal. + p < 0.05.

Diferente de limpio en el mismo grupo.  $^{\circ}$  p < 0.05.

Diferente de GDX-BE y GDX+BE+P en el mismo grupo.  $\Delta$  P < 0.05.

### e) Conclusiones

La lordosis puede ser inducida en ratas macho gonadectomizadas mediante el tratamiento con altas dosis de estrógenos (Yamanouchi y Arai, 1975). Este reflejo puede ser incrementado si adicionalmente se lesionan determinadas estructuras neuronales. Por ejemplo, en las ratas macho gonadectomizadas lesiones en el área preóptica media potencian la expresión de la respuesta de lordosis inducida por el tratamiento con estradiol y progesterona (Kondo y col 1990, Olster 1993). La lesión de la fibras ventrales del septum también incrementan la expresión de la lordosis en machos gonadectomizados tratados con estradiol o con estradiol más progesterona (Yamanouchi y Aria, 1985). Adicionalmente se ha reportado que otra influencia inhibitoria existe en el núcleo dorsal del rafé, ya que lesiones en este núcleo facilitan la respuesta de lordosis en ratas macho tratadas con

estrógenos (Kakeyama y Yamanouchi, 1992). El núcleo dorsal del raqué establece conexiones con el septum, al área preóptica medial y el hipotálamo ventromedial, las cuales como ya se mencionó, son estructuras críticas en el control de la lordosis. Yamanouchi y colaboradores (Kakeyama y Yamanouchi, 1997; Tsukahara y Yamanouchi, 2001) han propuesto que el núcleo dorsal del raqué inhibe la lordosis activando la función del área preóptica media y/o inhibiendo al hipotálamo ventro medial. Mientras que el área preóptica media a su vez inhibe al septum lateral (Kondo et al., 1990).

Nuestra hipótesis es que los machos no-copuladores tienen una alteración funcional a nivel del área preóptica media ya que esta es una de las estructuras que inhiben la conducta de lordosis en los machos, por lo tanto evaluamos si en los machos no-copuladores es posible potenciar la respuesta de lordosis. Encontramos que los machos no-copuladores no están feminizados conductualmente al menos en la ejecución de la respuesta de lordosis, ya que tanto los machos no-copuladores y copuladores en todas las condiciones hormonales fueron igualmente receptivos. Por otra parte, las hembras gonadectomizadas, el tratamiento hormonal fue capaz de inducir altos niveles de receptividad femenina demostrando que el tratamiento hormonal fue eficiente. Estos resultados pueden deberse a que la inhibición de la respuesta de lordosis en la rata macho no es controlada únicamente por el área preóptica media. Otras estructuras que también tienen un papel inhibitorio sobre esta conducta como el núcleo dorsal del raqué y el septum pueden estar inhibiéndola.

Además, las pruebas de preferencia olfatoria muestran que los machos copuladores y no-copuladores gonadalmente intactos y con previa experiencia sexual femenina pasan más tiempo investigando el contenedor con aserrín impregnado de secreciones de hembras en estro que el expuesto a secreciones de machos, aunque esta preferencia es mayor en los machos copuladores que en los no-copuladores. Cuando los machos fueron gonadectomizados y tratados con benzoato de estradiol, solamente prefirieron el olor de las hembras en estro con respecto a los olores neutros; con el tratamiento de benzoato de estradiol y de progesterona los machos no prefirieron ningún tipo de olor. Estos resultados muestran que el tratamiento con estradiol y progesterona en los machos copuladores y no-copuladores no son suficientes para que los machos prefieran el olor de los machos

sexualmente expertos de los olores de las hembras en estro.

## **5.4 Experimento 3. Motivación sexual, preferencia olfatoria y activación del sistema de proyección vomeronasal por claves sexualmente relevantes en ratas macho no-copuladoras y sexualmente inexpertas.**

### **a) Antecedentes**

En la rata, la expresión de la conducta sexual masculina depende de una cuidadosa selección de un coespecífico con el cual interactuar. Los machos deben ser capaces de diferenciar a las hembras de los machos y a las hembras en sus diferentes ciclos hormonales. De esta manera si los machos no identifican/prefieren a las hembra en estro no inician las conductas precopulatorias o motivacionales y por lo tanto la cópula no se lleva a cabo. Se ha demostrado que los machos sexualmente activos pasan más tiempo cerca de una hembra en estro (Agmo, 2003; Bakker et al., 1996; Domínguez-Salazar et al., 2002; López et al., 1999; Romero et al., 1990) y las hembras pasan más tiempo cerca de un macho sexualmente activo (Bakker et al., 1996; Domínguez-Salazar et al., 2002; Hetta y Meyerson, 1978). Los machos prefieren el olor (Le Magnen, 1952; Stern, 1970), la orina (Carr et al., 1962; Gottreich et al., 2000; Nyby et al., 1985) y las secreciones vaginales de las hembras en estro (Gregory et al., 1975; O'Connell y Meredith, 1984) en lugar de las de en anestro o de machos. Los olores son detectados por dos sistemas: el sistema olfatorio principal y el accesorio o vomeronasal. En general se ha propuesto que en la rata el sistema olfatorio principal detecta olores volátiles generados principalmente por la comida y/o presas (Firesten, 2001; Laurent, 1999; Leon y Jonson, 2003), mientras que el sistema de proyección vomeronasal, detecta olores sexualmente relevantes (Bargmann, 1997; Halpern, 1987; Keverne, 1999; Tirindelli et al., 1998). En nuestro laboratorio y en varios grupos de investigación se ha demostrado que en los machos sexualmente expertos, la actividad neuronal del sistema de proyección vomeronasal incrementa cuando los animales son expuestos a olores de hembras en estro (Bressler y Baum, 1996; Colcen et al., 1997; Domínguez-Salazar et al., 2002; Paredes et al., 1998).

Durante mi maestría, demostramos que en pruebas de preferencia sexual donde los machos pueden oler, ver, oír e interactuar sexualmente con hembras en estro o machos sexualmente activos, los machos copuladores pasan más tiempo con la hembra en estro en lugar de con el macho sexualmente activo (Portillo y Paredes, 2003). Los machos no-copuladores invierten el mismo tiempo con los individuos de ambos sexos. Las pruebas de preferencia sexual, no permiten determinar si los machos no-copuladores no prefieren a las hembras en estro por tener alteraciones en los componentes motivacionales y/o en los consumatorios de la conducta sexual masculina. Agmo (2003) desarrolló una prueba en la cual los sujetos experimentales pueden ver, oír y oler pero no tener contacto físico con los animales estímulos (prueba de motivación sexual). Esta prueba permite investigar si los machos están sexualmente motivados para preferir un macho sexualmente activo o a una hembra en estro.

También estamos interesados en evaluar si los machos no-copuladores son capaces de detectar adecuadamente los olores provenientes de comida y determinar si prefieren los olores de las hembras en estro de los de hembras en anestro y de machos sexualmente activos. De la misma manera resulta interesante cuantificar la actividad neuronal del sistema de proyección vomeronasal y del bulbo olfatorio accesorio durante la procesamiento de olores sexualmente relevantes.

La hipótesis predice que los machos no-copuladores no prefieren a las hembras en estro y que esta conducta puede deberse a alteraciones para detectar y/o procesar a nivel del sistema nervioso central los olores sexualmente relevantes.

El primer objetivo fue evaluar mediante la prueba de motivación sexual (Agmo, 2003) si los machos no-copuladores prefieren a una hembra en estro o a un macho sexualmente activo. El segundo objetivo fue evaluar la capacidad quimiosensorial mediada por el sistema olfatorio principal en una prueba en la cual una pieza de manzana se esconde en una caja de aserrín (Curtis et al., 2001). Si el sujeto no encuentra la manzana en un tiempo máximo de 5 min se considera anósmico (Curtis et al., 2001; Edwards et al., 1996). Además, evaluamos si los machos no-copuladores prefieren los olores de las hembras en estro a los de las hembras en anestro o a las de los machos. En el tercer objetivo evaluamos si la actividad neuronal del sistema de proyección vomeronasal y del bulbo olfatorio

principal (capa granular) es similar entre machos copuladores y no-copuladores cuando estos son expuesto a olores de hembras en estro. Un grupo de machos sin experiencia sexual fueron incluidos en todos los experimentos para determinar si los datos obtenidos de los machos no-copuladores se deben solamente a su inexperiencia heterosexual.

## **b) Método**

### **Pruebas de motivación sexual**

Las pruebas de motivación sexual fueron realizadas de acuerdo al procedimiento descrito por Agmo (2003). Estas se realizaron en una arena oval de acrílico negro (100 X 50 cm). En las paredes más largas de la arena se hicieron unas aberturas a la altura del piso, las cuales fueron cubiertas con una malla de alambre. En cada abertura se ensambló una caja (15 X 25 X 25 cm de alto) dentro de la cual fue colocado un animal incentivo (una hembra en estro o un macho sexualmente activo). Este procedimiento tiene la ventaja de que es posible cambiar aleatoriamente las cajas que contienen a los animales incentivos sin que los olores se mezclen. En frente de las cajas que contienen a los animales incentivos, se delimitó una zona (20 X 30 cm), la cual se denominó zona incentiva. Para iniciar el experimento, los sujetos fueron habituados a la arena en tres sesiones de 10 min cada una. Durante este procedimiento, los animales incentivos no estuvieron presentes. La prueba fue similar a la habituación, pero en este caso los animales incentivos fueron colocados en cada una de las cajas laterales. En las pruebas los machos experimentales pudieron oír, ver y oler a los animales incentivos pero no copular con ellos. Finalmente, se registró el tiempo que los animales experimentales pasaron en cada una de las zonas incentivas (el criterio utilizado fue que las ratas colocaron sus dos miembros anteriores dentro de la zona). La prueba tuvo una duración de 10 min.

### **Pruebas de capacidad olfatoria**

En estas pruebas cada sujeto experimental fue colocado en una caja de acrílico (25 X 50 X 15 cm) la cual tuvo el piso cubierto con aserrín limpio. En cada prueba, un pedazo de manzana ( $\pm 0.5 \text{ mm}^3$ ) fue escondido aleatoriamente en una de las cuatro esquinas de la

caja. Se registró el tiempo que les tomó a las ratas encontrar e ingerir la fruta. Si las ratas tardaron más de 5 min en encontrar la manzana, se eliminó al sujeto del experimento (Bakker et al., 2002; Curtis et al., 2001; Edwards et al., 1996). Usando este criterio dos machos copuladores y dos no-copuladores (tomados de un grupo inicial de 12 sujetos de cada grupo) fueron eliminados de este estudio. Las pruebas se realizaron por duplicado, con un intervalo entre ellas de una semana.

### **Pruebas de preferencia olfatoria**

Estas se realizaron como ya se describió en el experimento 2. Todas las ratas fueron probadas en dos condiciones. En la primera los machos pudieron escoger entre oler platos que contenían aserrín: expuesto a hembras en estro, expuesto a machos sexualmente activos o limpio. Una semana después, las ratas fueron probadas en una segunda condición en la cual la elección fue entre aserrín: expuesto a hembras en estro, expuesto a hembras en anestro o limpio. Durante la prueba se colocó al sujeto en el centro de la caja y se cronometró el tiempo que pasó investigando / oliendo cada uno de los platos. La prueba tuvo una duración total de 10 min y se realizó por duplicado. Para el análisis de los datos fue utilizado el valor promedio (revisión en Bakker, 1996).

### **Inmunodetección de Fos**

Al finalizar las pruebas conductuales, las ratas fueron colocadas por 90 min en camas con aserrín expuesto a secreciones de hembras en estro o limpio. Posteriormente fueron sacrificadas con una sobredosis de pentobarbital intraperitoneal (Sedal Vet, 1ml/rata). Los animales fueron perfundidos intracardialmente con una solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M, pH 7.4) y con paraformaldehído al 4% en 0.1 M de solución amortiguadora de fosfatos. Los cerebros ya perfundidos fueron extraídos y fijados una hora en paraformaldehído, después fueron transferidos a una solución de sacarosa al 25% en 0.1 M de solución amortiguadora de fosfatos para su crioprotección. El tejido neuronal fue cortado en rebanadas de 35  $\mu$ m usando un microtomo (Leica SM 2000R) conectado a una unidad de enfriamiento (Phy Sitemp BFS-30TC controller). los cortes fueron lavados en un inicio con solución amortiguadora de fosfatos al 0.1 molar, posteriormente con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1% y finalmente con solución amortiguadora de fosfatos 0.1

M. Las muestras fueron incubadas por 16 horas con el anticuerpo primario para Fos DCH-1 de Santa Cruz (1:5000 sc-52 / 0.52% tritón X 100 / en 0.1 M solución amortiguadora de fosfatos). DCH-1 es un anticuerpo monoclonal, obtenido del suero de conejo, el cual está dirigido contra la secuencia N-terminal de Fos de la rata. Al término de la incubación los cortes fueron enjuagados con solución de lavado (0.02% tritón X 100 / 0.1 M solución amortiguadora de fosfatos) y después incubadas en anticuerpo secundario (1:200 inmunoglobulina G anticonejo en cabra biotinilado/ 0.52% tritón X 100/ en 0.1M de solución amortiguadora de fosfatos). Posteriormente a la incubación en el anticuerpo secundario los cortes fueron lavados e incubados en el complejo avidina-biotina por 3 horas, terminado el tiempo de incubación este compuesto fue lavado utilizando una solución amortiguadora de fosfatos al 0.1 M. Para finalizar, las secciones fueron reveladas mediante la reacción de nickel 3,3'-diaminobenzidina (5ml de H<sub>2</sub>O/ 2 gotas de solución amortiguadora/ 4 gotas de diaminobenzidina/ 2 gotas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ 2 gotas nickel). Los cortes fueron montados en portaobjetos cubiertos de gelatina, puestos a secar y enjuagados con agua destilada y finalmente fueron cubiertos con cubreobjetos usando una resina comercial. Esta inmunohistoquímica produjo una reacción entre negra y gris en los núcleos neuronales, a los que nos referiremos como células inmunorreactivas para Fos.

Para cuantificar el número de neuronas inmunorreactivas a Fos, se utilizó un procedimiento descrito por Domínguez y colaboradores (2002). Brevemente, las secciones fueron codificadas de tal forma que no tuviéramos conocimiento del tratamiento y del grupo del sujeto. Se seleccionaron cortes de las siguientes estructuras neuronales: bulbo olfatorio principal capa granular, bulbo olfatorio accesorio (capa mitral y granular), amígdala anterior y posterior, núcleo de la cama de la estría terminal y área preóptica media. Solamente cuantificamos el número de células positivas a Fos en el hemisferio derecho (Figura, 5). Estas células se contaron usando un sistema de análisis de imágenes (Image-pro, Media Cybernetics, Silver Spring, MD) con una cámara digital Hitachi conectada a un microscopio Olympus B X 60. Al menos tres secciones adyacentes de cada región neuronal fueron analizadas.

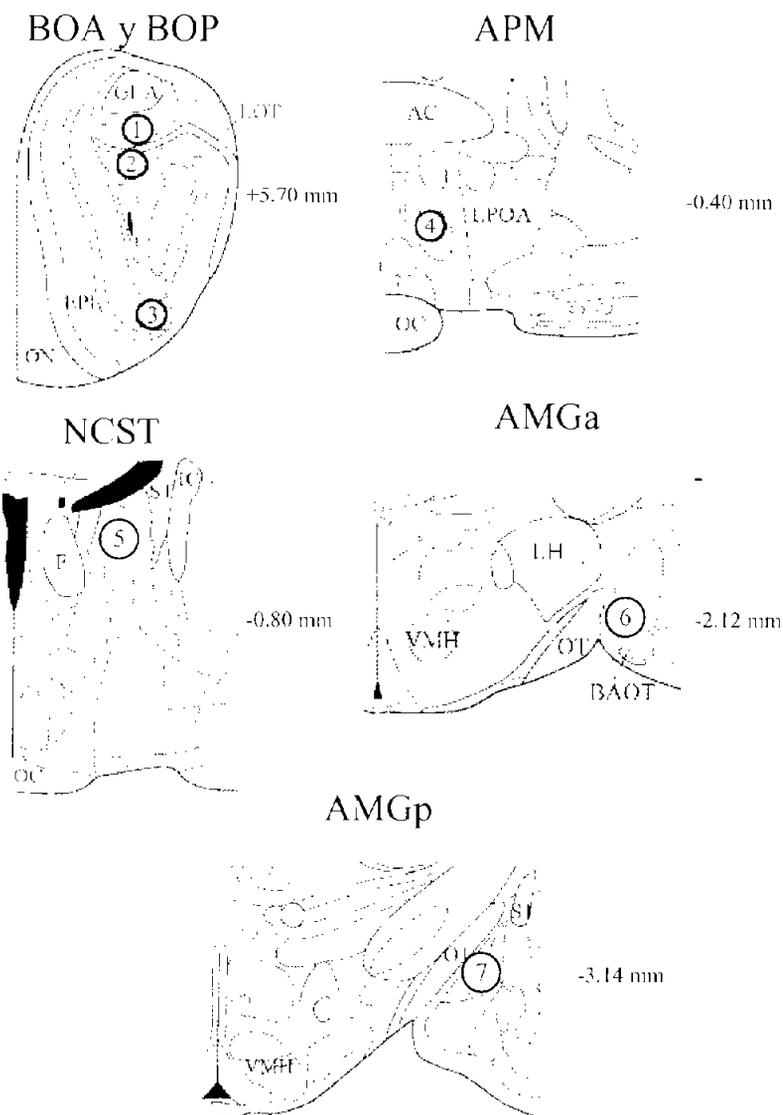


Figura 5.- Esquema que muestra la localización de las diferentes regiones cerebrales (números dentro de los círculos) en los cuales se contó el número de células positivas a Fos. 1) capa mitral del bulbo olfatorio accesorio (BOA), 2) capa granular del BOA, 3) capa granular del bulbo olfatorio principal (BOP). 4) área preóptica media (APM), 5) núcleo de la cama de la estria terminal (NCST), 6) amígdala anterior (AMGa) 7) amígdala posterior (AMGp). GLA, capa glomerular del BOA: LOT, tracto olfatorio lateral; EPI, capa plexiforme externa del BOP; ON, capa del nervio olfatorio; LPOA, área preóptica lateral; OC, quiasma óptico; IC, capsula interna; ST, estria terminal; F, fornix; VMH, núcleo ventro medial del hipotálamo; OT, tracto óptico; LH, hipotálamo lateral; BAOT, núcleo de la cama del tracto olfatorio accesorio. La distancia (en mm) de cada sección del cerebro esta dada a partir de bregma. Este esquema fue tomado de Paxinos y Watson (1997), modificado por Paredes et al., (1998).

### **e) Análisis estadístico**

Los datos de las pruebas de motivación sexual tuvieron una distribución normal por lo que se realizó un análisis de varianza de 3 X 2 (grupo X animal incentivo). En caso de diferencias significativas se utilizaron las pruebas *post hoc* de la mínima diferencia de Fisher. Los datos de las pruebas de capacidad olfatoria no tuvieron una distribución normal por lo que fueron analizadas utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. En los experimentos de preferencia olfatoria se usó un análisis de varianza de 3 X 3 (grupo X tipo de aserrín). En caso de diferencias significativas, se realizó la prueba de Fisher. Los datos del número de neuronas positivas a Fos no tuvieron una distribución normal por lo que fueron analizados por una prueba Kruskal Wallis seguida de una prueba U Mann Whitney.

### **d) Resultados**

#### **Pruebas de motivación sexual**

En estos experimentos encontramos un efecto significativo en la interacción grupo zona incentiva ( $F_{(2,47)} = 11.9606$ ,  $p < 0.0001$ ) y en la zona incentiva ( $F_{(1,47)} = 50.90575$ ,  $p < 0.0001$ ) pero no en el factor grupo ( $F_{(2,47)} = 2.58$ ,  $p = 0.09$ ). Las comparaciones *post hoc* demostraron que aunque los machos sin experiencia sexual y copuladores pasaron más tiempo en la zona incentiva de la hembra en estro que en la del macho sexualmente activo, esta preferencia fue mayor en los machos copuladores. Los machos no-copuladores no tuvieron preferencia por ninguna de las dos zonas incentivas, aunque pasaron más tiempo en la zona incentiva del macho sexualmente activo que los copuladores  $p < 0.05$  (Figura 6).

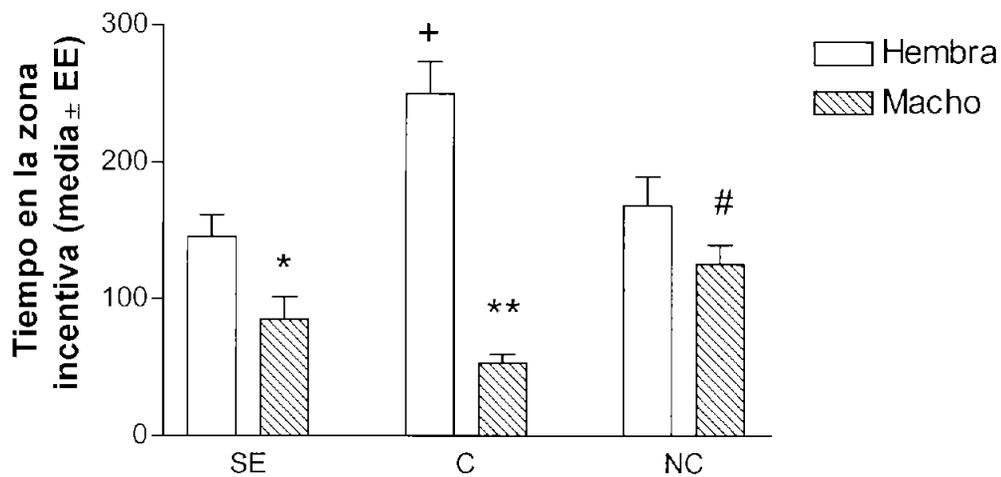


Figura 6.- Pruebas de motivación sexual en machos sin experiencia sexual (SE, n = 8), copuladores (C, n = 8) y no copuladores (NC, n = 8). Los resultados en segundos se expresan como la media  $\pm$  error estándar.

Diferente del tiempo en la zona incentiva de la hembra en estro en el mismo grupo. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

Diferente de macho sin experiencia sexual y no-copulador en el tiempo dentro de la zona incentiva con la hembra en estro. +  $p < 0.05$ .

Diferente de macho copulador en el tiempo dentro de la zona incentiva del macho sexualmente activo. #  $p < 0.05$ .

### Pruebas de capacidad olfatoria

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en la latencia para encontrar la pieza de manzana (K-W prueba:  $\chi^2_{(2)} = 0.03$ ,  $p = 0.98$ ). Los promedios fueron para los machos sin experiencia sexual  $43 \pm 16$  seg, n = 10; para los copuladores  $30 \pm 3$  seg, n = 10; y para los no-copuladores  $34 \pm 7$  seg, n = 10. Estos resultados indican que el procesamiento de las claves olfatorias en el bulbo olfatorio principal es similar entre los tres grupos de animales.

### Pruebas de preferencia olfatoria

Los datos obtenidos de las pruebas de preferencia olfatoria entre aserrín expuesto a secreciones de hembras en estro, a machos sexualmente activos y limpio (Tabla 5, A) fueron analizados mediante un análisis de varianza, en estas encontramos diferencias en la interacción grupo por tipo de olor ( $F_{(4,125)} = 5.91851$ ,  $p = 0.0002$ ) en el factor grupo ( $F_{(2,125)} = 39.96225$ ,  $p = 0.0001$ ) y en el factor tipo de olor ( $F_{(2,125)} = 4.68804$ ,  $p = 0.011$ ). Las pruebas *post hoc* de Fisher demostraron que los machos sin experiencia sexual, copuladores y no-copuladores pasaron más tiempo oliendo el contenedor con el aserrín expuesto a las secreciones vaginales de hembras en estro, en lugar del expuesto a secreciones de machos sexualmente activos y del limpio. Se tomo una  $p < 0.05$  como valor significativo. Sin embargo los machos copuladores pasaron significativamente más tiempo oliendo el aserrín expuesto a secreciones de hembras en estro que los animales sin experiencia sexual y no-copuladores. Estos resultados son similares a los obtenidos en la tabla 4 (pág ) en la condición hormonal intacto, demostrando que los machos no-copuladores aunque prefieren los olores de la hembras en estro esta preferencia es deficiente.

En los experimentos donde se les dió a elegir a los machos entre oler aserrín expuesto a secreciones vaginales de hembras en estro, expuesto a los olores de hembras en anestro y limpio (Tabla 5, B) encontramos un efecto significativas en la interacción grupo por tipo de olor ( $F_{(4,125)} = 3.90309$ ,  $p = 0.0052$ ) el factor grupo ( $F_{(2,125)} = 37.58898$ ,  $p = 0.0001$ ) y tipo de olor ( $F_{(2,125)} = 11.16725$ ,  $p = 0.0001$ ). Las pruebas *post hoc* (se tomaron como significativos aquellos valores de  $p < 0.05$ ) revelaron que los machos no-copuladores y copuladores prefirieron oler el aserrín expuesto a secreciones de hembras en estro que el expuesto a hembras en anestro y el limpio. Sin embargo, esta preferencia fue significativamente mayor en el grupo de machos copuladores que en el grupo de no-copuladores.

Tabla 5. - Preferencia olfatoria en machos sin experiencia sexual, copuladores y no-copuladores. En A, se muestran los resultados de las pruebas en las que a los animales se les da a elegir entre oler aserrín limpio (control), aserrín expuesto a secreciones de macho o aserrín expuesto a secreciones vaginales de hembras en estro. En B, las pruebas de elección entre aserrín limpio, aserrín expuesto a secreciones de hembras en estro o de hembras en anestro. Los datos en segundos, se expresan como la media  $\pm$  error estándar y fueron analizadas mediante un análisis de varianza seguido de la prueba de Fisher. El número de sujetos se muestra entre paréntesis.

A

Tipo de aserrín	Limpio	Macho	Estro
Grupo			
Sin experiencia (n = 14)	10.4 $\pm$ 2	16.2 $\pm$ 2	27.7 $\pm$ 3 *
Copulador (n = 14)	9.5 $\pm$ 2	13.8 $\pm$ 1	54.6 $\pm$ 10 *+
No copulador (n = 14)	9.5 $\pm$ 1	14.8 $\pm$ 2	27.1 $\pm$ 4 *

B

Tipo de aserrín	Limpio	Anestro	Estro
Grupo			
Sin experiencia	9.8 $\pm$ 1	20 $\pm$ 3	28.2 $\pm$ 4 °
Copulador	16.6 $\pm$ 4	23.2 $\pm$ 2	51 $\pm$ 5 *+
No copulador	13.3 $\pm$ 2	17.5 $\pm$ 3	27.6 $\pm$ 3 *

Diferente de limpio y macho/anestro, dentro del mismo grupo. \*  $p < 0.5$

Diferente de macho sin experiencia sexual y no-copulador en la misma condición. +  $p < 0.05$ .

Diferente de limpio, dentro del mismo grupo. °  $P < 0.05$ .

### **Actividad neuronal del sistema de proyección vomeronasal.**

Las regiones en las cuales fueron cuantificadas el número de neuronas positivas a Fos incluyen la capa granular del bulbo olfatorio principal y las estructuras cerebrales que conforman al sistema de proyección vomeronasal (Figura 5). En la figura 7, se muestran ejemplos de células positivas a Fos en el área preóptica media de machos sin experiencia sexual, copuladores y no-copuladores.

En la capa granular del bulbo olfatorio principal no encontramos diferencias en el número de neuronas positivas a Fos (Figura 8), entre machos sin experiencia sexual, copuladores y no-copuladores expuestos a olores de hembras en estro. Tampoco se observó un incremento en el número de neuronas positivas a Fos cuando los animales fueron expuestos a aserrín de hembras en estro en comparación al limpio en esta región.

En la capa mitral del bulbo olfatorio accesorio se observó un incremento en la actividad neuronal en respuesta al olor de hembras en estro en los tres grupos (K-W prueba:  $\chi^2_{(5)} = 18.27$ ,  $p < 0.003$ ). De la misma manera en los machos copuladores fueron cuantificadas un gran número de neuronas positivas a Fos en respuesta a los olores de hembras en estro en todas las estructuras que integran al sistema de proyección vomeronasal. En los machos sin experiencia sexual se encontró un incremento en el número de neuronas positivas a Fos en el área preóptica media (K-W prueba:  $\chi^2_{(5)} = 16.09$ ,  $p < 0.007$ ). No fueron observados cambios en la respuesta a Fos en el grupo de machos no-copuladores.

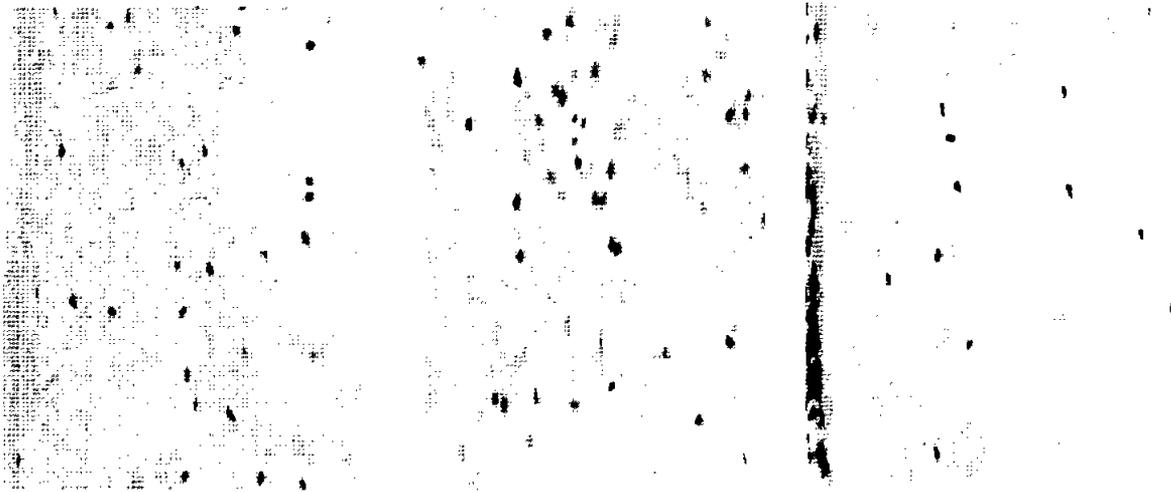


Figura 7.- Fotomicrografía representativa que muestra las células inmunoreactivas a Fos en el área preóptica media de machos sin experiencia (A), copuladores (B) y no-copuladores (C). 3v tercer ventrículo.

# Número de células positivas a Fos (media±EE)

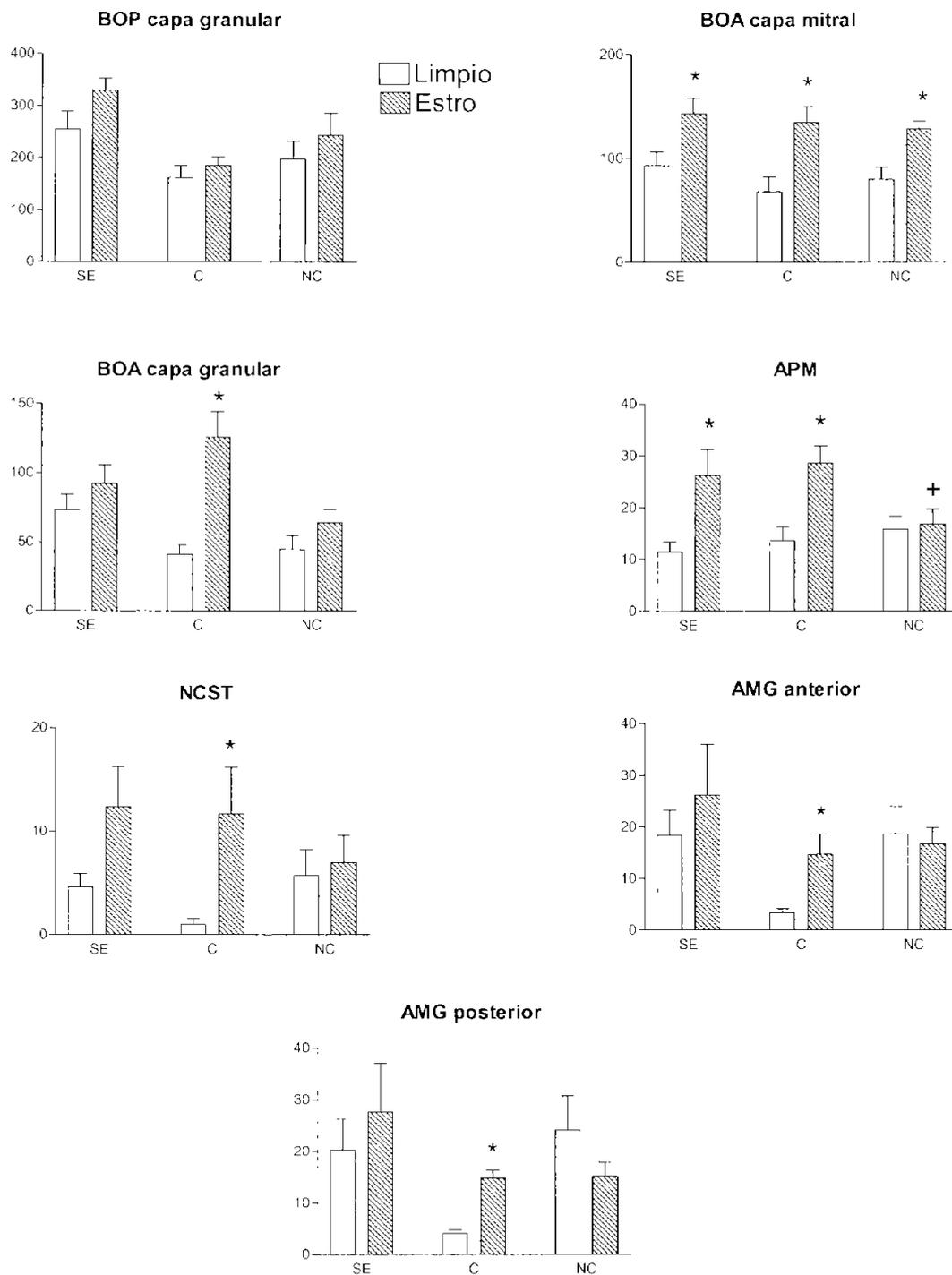


Figura 8.- Número de células inmunopositivas a Fos en: el bulbo olfatorio principal (BOP) capa granular, bulbo olfatorio accesorio (BOA) capa mitral y granular, el área preóptica media (APM), el núcleo de la cama de la estría terminal (NCST), la amígdala (AMG) anterior y posterior de machos sin experiencia sexual (SE, n = 7), copuladores (C, n = 7) y no-copuladores (NC, n = 7) expuestos a aserrín limpio (Limpio) o a aserrín con secreciones vaginales de hembras en estro (Estro). Los datos se expresan como la media ± error estándar.

Diferente de limpio en el mismo grupo experimental. \* p < 0.05.

## **e) Conclusiones**

Los datos de las pruebas de motivación sexual mostraron que los machos copuladores prefirieron claramente a las hembras en estro, mientras que los machos no-copuladores pasaron el mismo tiempo con ambos animales incentivos. Estas diferencias no pueden ser atribuidas a la falta de experiencia sexual en los machos no-copuladores ya que los machos sin experiencia sexual prefirieron a las hembras en estro, aunque esta fue significativamente menor a la observada en los machos copuladores. Resultados similares fueron obtenidos en las pruebas de preferencia sexual, en las cuales los machos pueden oler, ver, oír y tener contacto físico con las hembras receptivas o los machos sexualmente activos (Portillo y Paredes, 2003). Lo anterior sugiere que independientemente de que los machos no-copuladores puedan interactuar físicamente con el animal estímulo o dicho contacto sea impedido, no prefieren a las hembras en estro de los machos sexualmente activos. Estas diferencias entre machos copuladores y no-copuladores no se deben solamente a la experiencia sexual, ya que los machos sin experiencia sexual prefirieron a las hembras en estro. Por lo que podemos proponer que en los machos no-copuladores tanto los aspectos motivacionales como los consumatorios de la conducta sexual masculina están alterados.

Por otro lado, varios estudios han demostrado que las claves olfatorias contribuyen a la preferencia sexual por las hembras en estro en varias especies de mamíferos (Kelliher et al., 1998; Mossman y Dickamer, 1996; Petrulis et al., 1999; Sawrey y Dewsbury, 1994; Stern, 1970). Los machos copuladores y no-copuladores prefirieron los olores de las hembras en estro del de las hembras en anestro o de los machos sexualmente activos. Sin embargo esta preferencia fue significativamente menor en los machos no-copuladores que en los copuladores. Los machos sin experiencia sexual prefirieron los olores de las hembras en estro con respecto a los machos sexualmente activos pero no sobre el de las hembras en anestro. Estas diferencias en los machos sin experiencia sexual pueden deberse a que las feromonas de las hembras en estro son muy diferentes de las de los machos, por lo que es más fácil discriminar entre ellos. Sin embargo para diferenciar entre los olores de las hembras en diferentes estadios hormonales las señales olfatorias deben ser más parecidas y

se requiere de una previa experiencia sexual para diferenciarlas. Los machos no-copuladores, aunque no copularon estuvieron en contacto físico en cuatro pruebas con hembras en estro y este tipo de estimulación parece ser suficiente para que los machos puedan discriminar entre el olor de las hembras en estro del de las hembras en anestro.

Se ha propuesto que la preferencia por los olores de las hembras en estro al menos dependen de los niveles hormonales y de la experiencia sexual previa del sujeto experimental. Por ejemplo, los machos que han sido gonadectomizados no prefieren los olores de las hembras en estro y los tratamientos con propionato de testosterona reestablecen esta preferencia (Agmo, 2003; Paredes et al., 1998). En la rata no-copuladora la deficiente preferencia por los olores de las hembras en estro no es debida a bajos niveles de testosterona, ya que los tratamientos con altas dosis de propionato de testosterona en estos machos no incrementan su preferencia por este tipo de olores (Portillo y Paredes, 2003). La importancia de la experiencia sexual previa en la preferencia olfatoria no es clara Carr y colaboradores (Carr et al., 1965) demostraron que únicamente los machos con experiencia heterosexual prefieren los olores de las hembras en estro con respecto a los de las hembras en anestro. Contrariamente Agmo (2003) y Le Magnen (1952) reportaron que los machos independientemente de su previa experiencia sexual prefieren los olores de las hembras en estro. Estas diferencias pueden deberse al método utilizado. En los experimentos de Carr (1965) las secreciones de los animales se mezclan con el olor del aserrín. Mientras que en los de Agmo (2003) y Le Magnen (1952) las heces, la orina o las secreciones vaginales no son mezcladas con ningún tipo de olor. De hecho Agmo (2003) realizó experimentos en los cuales mezcló los desechos animales con otro olor (aceite de capclín) y en estas pruebas los machos sin experiencia sexual no prefirieron los olores de las hembras en estro (Agmo, 2003). En nuestros experimentos los machos sin experiencia sexual prefieren los olores de las hembras en estro con respecto de los machos, pero al igual que en los no-copuladores esta preferencia fue significativamente menor a la observada en los copuladores. Por lo anterior proponemos que en los machos no-copuladores su deficiente preferencia por los olores de las hembras en estro se puede deber a que no copulan con hembras sexualmente receptivas y a que este tipo de olores fueron mezclados con el del aserrín. Por lo que en el futuro es necesario determinar si los machos no-

copuladores prefieren los olores de las hembras en estro, en experimentos en los cuales estos olores sea presentados sin ser mezclados con aserrín.

En las pruebas de capacidad olfatoria todos los grupos de machos tuvieron la misma habilidad para identificar los olores relacionados a la comida, sugiriendo que la actividad del sistema olfatorio principal es normal en los machos no-copuladores.

Los datos del número de células positivas a Fos muestran, que en los machos copuladores incrementó la actividad neuronal de todas las estructuras que integran al sistema de proyección vomeronasal en respuesta a la detección de olores de las hembras en estro, confirmando lo ya reportado en la literatura (Bressler y Baum, 1996; Coolen et al., 1997; Domínguez-Salazar et al., 2002; Heeb y Yahr, 1996; Kelliher et al., 1998; Kippin et al., 2003; Paredes et al., 1998a). En los machos sin experiencia sexual se observó un incremento en la actividad neuronal en la capa mitral del bulbo olfatorio accesorio y en el área preóptica media en respuesta a los olores de las hembras en estro, mientras que en los machos no-copuladores solamente se observó un aumento en la capa mitral del bulbo olfatorio accesorio. El hecho de que las estructuras que conforman al sistema vomeronasal no se activen en los machos no-copuladores durante el procesamiento neuronal de los olores de las hembras en estro puede ser una de las causas del por que no prefieran a las hembras en estro y tengan una preferencia deficiente por sus olores.

La actividad neuronal de la capa granular del bulbo olfatorio principal no incrementó en respuesta a los olores de las hembras en estro en ninguno de nuestros grupos, resultados similares fueron obtenidos por Fewell y Meredith (2002) quienes demostraron que en el hámster la exposición a las secreciones vaginales o la cópula con hembras sexualmente receptivas no incrementa la actividad neuronal del bulbo olfatorio principal. Estos datos apoya los resultados obtenidos previamente (Paredes et al., 1998, ) en el sentido de que el bulbo olfatorio principal al parecer no participa al menos directamente en la detección de los olores de las hembras en estro.

## **5.5 Experimento 4. Niveles sanguíneos de testosterona y estradiol y actividad de la enzima aromatasa en las ratas macho no-copuladoras**

### **a) Antecedentes**

Como ya se mencionó en el capítulo 2, la expresión de la conducta sexual masculina, depende de los niveles normales de testosterona. Por ejemplo, en la rata macho la gonadectomía genera una reducción en los niveles hormonales después de 24 horas de la cirugía (Krey y McGinnis, 1990) lo que induce una supresión gradual de la conducta sexual masculina. Estos efectos pueden ser revertidos mediante el tratamiento con propionato de testosterona (McGinnis et al., 1989; Putnam et al., 2001). La gonadectomía no sólo disminuye el coito, sino también afecta otros aspectos de la conducta sexual. De esta manera se ha descrito que mientras los machos gonadalmente intactos prefieren a las hembras en estro y sus olores de las hembras en anestro o de los machos sexualmente activos (Agmo, 2003; Bakker et al., 1996; Domínguez-Salazar et al., 2002; López et al., 1999; LeMagnen, 1952; Paredes et al., 1998), si son gonadectomizados dicha preferencia sexual declina rápidamente, pero puede ser restaurada mediante el tratamiento con propionato de testosterona (Agmo, 2003; Carr et al., 1965; Gottreich et al., 2000; Paredes et al., 1998). Se ha propuesto que los efectos conductuales de la testosterona son mediados por su conversión a estradiol mediante la enzima aromatasa, ya que en los machos gonadectomizados el tratamiento con benzoato de estradiol restaura parcialmente la cópula (Putman et al., 2002; Roselli et al., 2001). Además, la inhibición de la enzima aromatasa en los machos altera la cópula ya que estos animales no eyaculan y tienen una menor preferencia por las hembras en estro que los machos control (Brand et al., 1991; Vreburg et al., 1983). El 42% de los ratones sin el gen que codifica para la enzima aromatasa, no copulan y no prefieren a las hembras en estro ni sus olores (Bakker et al., 2002). La actividad de esta enzima se ha detectado en las principales áreas neuronales involucradas en el control de la conducta sexual masculina como son: el área preóptica peri-ventricular, el área preóptica media, el núcleo de la cama de la estría terminal, el núcleo ventro medial del

hipotálamo, y la amígdala corticomedial (Roselli et al., 1985). En resumen, la actividad de la enzima aromatasa y el estradiol son factores que pueden estar controlando tanto los aspectos motivacionales como los consumatorios de la conducta sexual masculina en la rata macho.

Los machos no-copuladores además de no copular no prefieren a las hembras en estro, probablemente debido a que detectan deficientemente sus olores (Experimento 3). Estas conductas pueden deberse a que en estos animales sus niveles de testosterona o estradiol estén bajos. Aunque se ha demostrado que los machos no-copuladores no tienen alteraciones en sus niveles plasmáticos de testosterona (Damassa et al., 1977; Stefanick y Davidson, 1985) es interesante evaluar sus niveles de estradiol. Otro aspecto de interés es evaluar si la actividad de la enzima aromatasa es normal en este tipo de ratas.

La hipótesis fue que los machos no-copuladores no tienen alteraciones en sus niveles sanguíneos de testosterona y estradiol, ni en la actividad de la enzima aromatasa.

El objetivo fue determinar si los machos no-copuladores tienen alteraciones en sus niveles sanguíneos de testosterona y/o estradiol y evaluar en estos animales la actividad de la enzima aromatasa en las regiones más importantes en el control de la conducta sexual masculina.

## **b) Metodología**

### **Medición de los niveles sanguíneos de testosterona y estradiol.**

Un grupo de machos copuladores y no-copuladores fueron anestesiados y se les extrajo sangre de la aurícula izquierda, la cual fue colectada individualmente en jeringas con heparina (1:10 en salina). Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 5,000 rpm durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Se recolectó el sobrenadante, el cual fue almacenado a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta que las muestras fueran procesadas. Los niveles plasmáticos de testosterona y estradiol fueron cuantificados en el laboratorio de Psiconcuroendocrinología Conductual de la Universidad Autónoma Metropolitana campus Ixtapalapa, mediante una colaboración con el Dr. Javier Velásquez-Moctezuma y la Dra. Socorro Retana. Las muestras fueron analizadas mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

utilizando una modificación del método reportado por Woodward y Emery (1987). Primeramente, fue mezclado 1 ml de plasma con 100 µl de una solución de 19-nortestosterona (5µg/ml en metanol) como estándar interno. Los esteroides fueron extraídos en 5 ml de dietiléter-diclorometano (60:40, v/v) mezclando fuertemente (Vortex Mixer) e inmediatamente después fue centrifugado por 5 min a 5,000 rpm. Se tomó la fase orgánica, la cual fue mezclada con 1 ml de agua grado cromatografía líquida de alta presión y centrifugada como se acaba de describir. La fase orgánica fue evaporada a temperatura ambiente usando nitrógeno. El residuo fue redisolto en 100 µl de metanol:agua (60:40, v/v). La precolumna (Symmetry C18, tamaño de partícula 3.5 µm, 2.1 X 10 mm adquiridas de Waters Corporation, Milford, Massachussets) y la columna (Symmetry C18, tamaño de partícula 5 µm; 2.0 X 150 mm; Waters) fueron equilibradas con una mezcla acetonitrilo:agua (65:35, v/v) con un flujo de 0.4 ml/min. La separación fue realizada a una temperatura de 40°C mediante un sistema de bombeo para gradiente (600 multi solvent delivery system, Waters). Los esteroides fueron cuantificados usando un detector de luz ultravioleta ajustado a 250 nm (486 Tunable UV/visible absorbance detector, Waters). Los resultados fueron analizados usando una unidad de trabajo para cromatografía (Máxima 820 chromatography data workstation, Waters).

Durante todas las mediciones fueron utilizadas una serie de estándares que cubren el rango de 0-34 ng/ml (testosterona y estradiol). La regresión lineal entre el pico máximo y la concentración de corticostestosterona fue calculada y usada para determinar los valores desconocidos. Una típica línea de regresión para testosterona fue:  $y = -0.774 - 0.2181X$  ( $r^2 = 0.99893$ ) y para estradiol  $y = 0.466 + 0.1923X$  ( $r^2 = 0.98943$ ). Los coeficientes de variación entre ensayos e intra ensayos para la testosterona fueron 2.93% y 7.12% respectivamente. Los promedios del coeficiente de variación intra-día e inter-día para el estradiol fueron 3.26% y 8.92%, respectivamente. El límite de detección para el estradiol y la testosterona fue de 0.05 ng/ml, usando 1 ml de muestra, a una relación señal:ruido de 2:1.

### **Actividad de la enzima aromatasasa**

Este experimento fue realizado mediante una colaboración con el Dr. Charles Roselli de la Universidad de Ciencias y Salud de Oregon. Para este proyecto conté con el apoyo económico del CONACyT en su programa de becas mixtas y de la Fundación Fogarty. La metodología más detallada puede consultarse en el trabajo del Dr. Roselli (1985). Brevemente los machos no-copuladores y copuladores fueron sacrificados mediante decapitación, el cerebro de cada rata fue extraído, congelado en hielo seco y almacenado a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su preservación. Los cerebros posteriormente fueron seccionados coronalmente a  $300\mu\text{m}$ , los cortes fueron montados en porta objetos y guardados a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Para obtener las rebanadas de cerebro los núcleos y las regiones neuronales específicas estas fueron aisladas mediante una disección bilateral usando cánulas metálicas calibradas a 500 y 1000  $\mu\text{m}$ . El tejido colectado con estas cánulas fue disgregado en solución amortiguadora de fosfatos para homogenizado (8 ml de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 92 ml de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.746 grs de KCl y 0.037 grs de EDTA) utilizando un sonicador. Posteriormente 100 ml de cada homogenizado se colocaron en tubos que contienen solución amortiguadora de homogenizado y solución amortiguadora de incubación (0.0141 g de 5 mM Glucosa-6-fosfato, 0.0076 grs de 1 mM NADPH+, 200  $\mu\text{l}$  de G-6-P DH y 34-40  $\mu\text{l}$  de 2 N KOH) y el sustrato radioactivo (androstenediona tritiada), todo se mezcló e incubó por 60 min a  $37^{\circ}\text{C}$  en baño María. Se reservaron muestras de tejido para determinar las concentraciones de proteínas mediante el método de Lowry (Lowry et al., 1951). Para terminar la reacción de incubación se añadió a cada tubo 0.4 ml de ácido tricloroacético el cual contuvo 20 mg de carbono, se mezcló cada tubo y se colocó en hielo. En el momento en que terminaron todas las incubaciones, las muestras fueron centrifugadas a 1200 grs por 5 min. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en columnas de intercambio iónico, las cuales separaron el agua generada durante la reacción de la enzima aromatasasa del sustrato contaminante. Posteriormente cada muestra fue eluida con 2 ml de agua destilada y se recuperó todo el eluyente en viales de centelleo. Las muestras fueron mezcladas con 10-12 ml de solución de centelleo y fueron colocadas en el contador de centelleo para cuantificar la radioactividad generada.

Para determinar la cantidad de proteínas en las muestras se utilizó el método de Lowry (Lowry et al., 1951). Primero se realizó una curva de concentración utilizando una proteína estandarizada a diferentes concentraciones. Se tomaron 20  $\mu$ l de tejido y se les añadió 180  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O destilada, posteriormente se les añadieron 1 ml de una solución de 1% CuSO<sub>4</sub>, 2% Na<sub>2</sub>C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> fueron mezclados e incubados por 10 min. Al terminar la incubación a cada muestra se le agregó 100  $\mu$ l de folin (2 partes de H<sub>2</sub>O por una de folin) se agitaron e inmediatamente después se dejaron incubando por 30 min. Finalmente las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro a 660 $\lambda$ .

### **c) Análisis estadístico**

Los datos de la cuantificación de los niveles sanguíneos de testosterona y estradiol, así como los de la actividad de la enzima aromatasa se analizaron mediante una prueba t de Student.

### **d) Resultados**

#### **Medición de los niveles sanguíneos de testosterona y estradiol.**

No se encontraron diferencias significativas en los niveles sanguíneos de testosterona ( $t = 0.97$ , d.f.: 14,  $p = 0.35$ ) y estradiol ( $t = -1.13$ , d.f.: 14,  $p = 0.28$ ) entre los machos copuladores y no-copuladores (Tabla 6).

Tabla 6.- Cuantificación de los niveles sanguíneos de testosterona y estradiol en machos copuladores y no-copuladores. Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar y fueron analizados mediante una prueba de t de Student.

	Testosterona (ng/ml)	Estradiol (ng/ml)
Copuladores (n = 8)	2.9 $\pm$ 0.40	0.044 $\pm$ 0.007
No-copuladores (n = 8)	2.6 $\pm$ 0.2	0.055 $\pm$ 0.008

#### **Actividad de la enzima aromatasa**

Los datos muestran que la actividad de la enzima aromatasa fue significativamente menor en los machos no-copuladores con respecto a los machos copuladores en el área preóptica media ( $t = 3.14$ , d.f: 14,  $p = 0.007$ ) (Figura 9). Sin embargo, no se encontraron diferencias en otras estructuras como son el núcleo de la cama de la estría terminal ( $t = 0.03$ , d.f: 14,  $p = 0.1$ ), el hipotálamo anterior ( $t = 1.02$ , d.f: 14,  $p = 0.3$ ), el núcleo ventro medial del hipotálamo ( $t = 1.76$ , d.f: 14,  $p = 0.1$ ) y la amígdala ( $t = -0.05$ , d.f: 14,  $p = 0.1$ ).

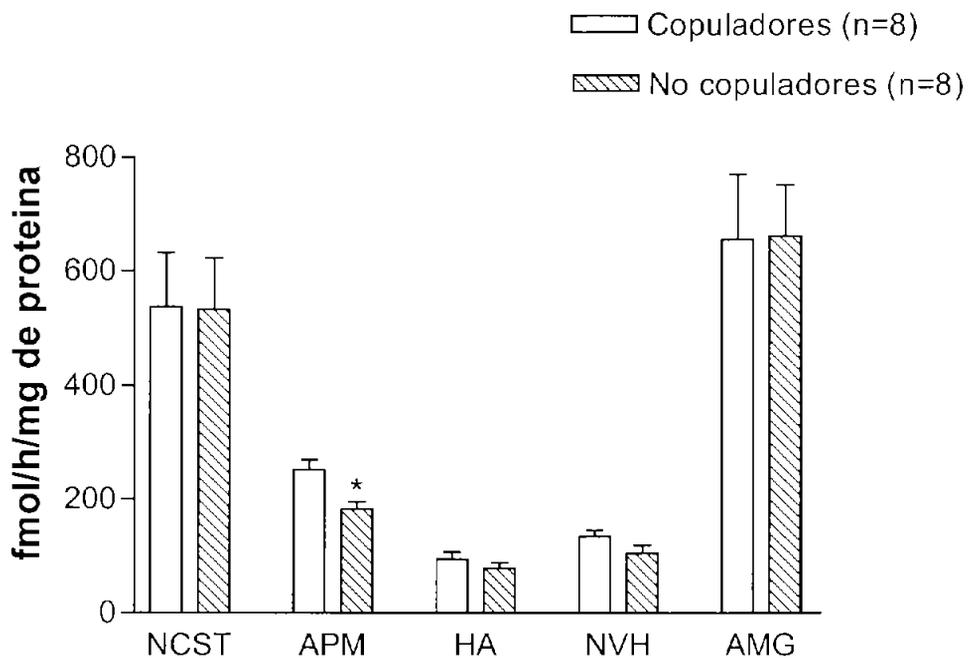


Figura 9.- Actividad de la enzima aromatasa en machos copuladores y no-copuladores. Las regiones estudiadas fueron: el núcleo de la cama de la estría terminal (NCST), el área preóptica media (APM), el hipotálamo anterior (HA), el núcleo ventro medial del hipotálamo (NVH) y la amígdala (AMG). Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar y fueron analizados mediante la prueba t de Student.

Diferente de macho copulador en la misma estructura cerebral. \*  $p = 0.007$ .

### e) Conclusiones

Nuestros datos concuerdan con trabajos previos (Damassa et al., 1977; Stefanick y Davidson, 1985) que demuestran que la ausencia de conducta sexual masculina en la rata

macho no-copuladora no se debe a bajos niveles sanguíneos de testosterona. Además demostramos que tampoco se deben a bajos niveles sanguíneos de estradiol.

La actividad de la enzima aromatasa disminuyó en el área preóptica media de los machos no-copuladores. Sin embargo, no hubo diferencias en la actividad de esta enzima entre los machos copuladores y no-copuladores en el núcleo de la cama de la estría terminal, el hipotálamo anterior, el hipotálamo ventro medial y la amígdala. Se ha reportado que la actividad de la enzima aromatasa también se encuentra disminuida en el área preóptica media de machos prenatalmente estresados que no pueden copular cuando son adultos (Reznikov, 2001). Estos datos apoyan la importancia de actividad de la enzima aromatasa en el control de la conducta sexual masculina. El hecho de que la actividad de esta enzima este disminuida en el área preóptica media apoya nuestra hipótesis de que los machos no-copuladores tienen alguna alteración funcional en esta estructura.

## **5.6 Experimento 5. Cuantificación del número de receptores a andrógenos y estrógenos $\alpha$ en la rata macho no-copuladora.**

### **a) Antecedentes**

En el experimento anterior demostramos que los machos no-copuladores no tienen alteraciones en los niveles sanguíneos de testosterona y estradiol. Por lo que al parecer esta no es una de las causas de su alteración conductual. Sin embargo, desconocemos si a nivel del sistema nervioso central las concentraciones de estas hormonas son normales. Por otro lado, existe la posibilidad de que exista una reducción en el número de receptores a andrógenos y/o estrógenos en las áreas más importantes para el control de la conducta sexual masculina y que por lo tanto los efectos de dichas hormonas no se ejerzan. Por ejemplo, los ratones machos con una mutación en el gen para los receptor a andrógenos (Tfm) son completamente infértiles (Young et al., 1989). De la misma manera, los ratones macho sin el gen para los receptores a estrógenos tipo  $\alpha$  no eyaculan, solamente entre el 0-12.5% intrometen y del 0-40% montan a las hembras en estro (Rissman et al., 1999). También los aspectos motivacionales están alterados, ya que los machos sin el gen para los receptores  $\alpha$  no prefieren los olores de las hembras en estro (Wersinger y Rissman, 2000). Esta conducta no se debe a deficiencias en la actividad del sistema vomeronasal ya que se observó un incremento en el número de neuronas positivas a la proteína Fos cuando los animales fueron expuestos a olores de hembras en estro (Wersinger y Rissman, 2000). Por lo que se propone que aunque los machos sin el gen para los receptores a estrógenos  $\alpha$  pueden detectar adecuadamente los olores de las hembras, estos no les son reforzantes ya que estos animales investigan poco la región anogenital tanto de ratas de su mismo sexo o diferente (Wersinger y Rissman, 2000). Todos estos datos sugieren que la actividad de los receptores a andrógenos y estrógenos tipo  $\alpha$  son fundamentales en la expresión de la conducta sexual masculina.

Los receptores a andrógenos y estrógenos están ampliamente distribuidos en todo el sistema nervioso central. Sin embargo, se ha reportado un mayor número de células con receptores a andrógenos en: el área preóptica media, el núcleo ventro medial del

hipotálamo, el núcleo lateral del septum, el núcleo medial y cortical de la amígdala, el núcleo de la cama de la estria terminal y el bulbo olfatorio accesorio (revisión en Simerly et al., 1990). Por otra parte las células con un mayor número de receptores a estrógenos  $\alpha$  se han localizado principalmente en: el área preóptica media, el núcleo de la cama de la estria terminal, el núcleo arcuato, la amígdala medial y el núcleo ventro medial del hipotálamo (Brown et al., 1988; Brown et al., 1990).

La hipótesis fue que los machos no-copuladores difieren de los machos copuladores en el número de receptores a andrógenos y/o estrógenos tipo  $\alpha$  en el área preóptica media.

El objetivo fue cuantificar el número de receptores a andrógenos y estrógenos tipo  $\alpha$  en los machos copuladores y no-copuladores en las diferentes estructuras que conforman el sistema vomeronasal y que incluyen: el bulbo olfatorio accesorio, la amígdala, el núcleo de la cama de la estria terminal y el área preóptica media.

## **b) Método**

### **Inmunohistoquímica para detectar células positivas a receptores a andrógenos**

Una vez que los animales fueron sacrificados y los cerebros fueron procesados como ya se mencionó en el experimento 3, las rebanadas de cerebro fueron lavadas 10 veces cada 5 min con solución amortiguadora de fosfatos al 0.1 M pH 7.4. Para evitar pegado inespecífico, las muestras se incubaron con 0.5 M de glicina por 30 min, posteriormente se lavaron y se incubaron con un bloqueador de 0.5 %  $H_2O_2$ , 4% suero normal de cabra en solución amortiguadora de fosfatos-tritón por 30 min. Posteriormente los cortes de cerebro fueron incubados de 36 a 48 hrs a 4°C con el anticuerpo primario PG-21 de Affinity Bioreagents, Inc. (5  $\mu$ g/ml en solución amortiguadora de fosfatos-tritón, 4% suero normal de cabra). El anticuerpo PG-21 detecta al receptor a andrógenos unido y no unido al ligando (Lu et al., 1998), es un anticuerpo policlonal de conejo que reconoce los primeros 21 aminoácidos del receptor a andrógenos de la rata. Transcurrido el tiempo de incubación las muestras fueron lavadas, para posteriormente incubarlas en anticuerpo secundario cabra anti conejo inmunoglobulina G (1:200) por 4 hrs. Después los cortes fueron lavados e incubados en el complejo avidina-biotina, la señal se reveló usando nickel

3,3'-diaminobenzidina. Las células positivas a receptores a andrógenos fueron aquellas que se marcaron en color negro-gris (Figura 10).

### **Receptores a estrógenos $\alpha$**

Los cortes de cerebro fueron incubadas en borohidrato de sodio 1% por 10 min, para remover los aldehídos. Posteriormente las muestras se lavaron e incubaron en  $H_2O_2$  en las siguientes concentraciones: 0.05%, 0.10% y 0.05% en solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M, pH 7.6) por 30, 60 y 30 min respectivamente. Seguidamente las muestras fueron lavadas con solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M, pH 7.6) e incubadas por 1 hr en 5% suero normal de cabra, 2% albúmina bovina, 0.3% tritón en solución amortiguadora de fosfatos. Después de la incubación los cortes se lavaron e incubaron en el anticuerpo primario MC-20 de Santa Cruz por 36-48 hrs a 4° C (0.25  $\mu$ g/ml en 1% suero normal de cabra, 2% albúmina bovina 0.3% tritón en solución amortiguadora de fosfatos), pasado este período los cortes fueron lavados e incubados en anticuerpo secundario cabra anti conejo inmunoglobulina G (1:400), posteriormente fueron incubados en avidina-biotina y la señal fue revelada utilizando nickel 3,3'-diaminobenzidina. Las células positivas a receptores a estrógenos  $\alpha$  al igual que en las otras inmunohistoquímicas fueron aquellas marcadas en negro-gris (Figura 10).

El número de células inmunorreactivas a receptores a andrógenos y estrógenos fueron cuantificadas de la misma forma a lo ya descrito para las células inmunopositivas para Fos.

### **c) Análisis estadístico**

Los datos del número de células positivas a receptores a andrógenos y estrógenos tuvieron una distribución normal y por lo tanto fueron analizados mediante una prueba t Student.

## **d) Resultados**

### **Cuantificación del número de receptores a andrógenos**

Los machos no-copuladores tuvieron un mayor número de células positivas a receptores a andrógenos que los machos copuladores, en la amígdala anterior ( $t = -2.32$ , d.f.: 14,  $p = 0.04$ ), posterior ( $t = -2.22$ , d.f.: 14,  $p = 0.04$ ) y en el área preóptica media ( $t = -2.38$ , d.f.: 14,  $p = 0.03$ ). No se encontraron diferencias significativas entre los machos copuladores y no-copuladores en el bulbo olfatorio accesorio capa mitral ( $t = 0.05$ , d.f.: 12,  $p = 0.96$ ) y granular ( $t = 0.56$ , d.f.: 12,  $p = 0.58$ ) y el núcleo de la cama de la estria terminal ( $t = 0.92$ , d.f.: 14,  $p = 0.37$ ) (Figura 11).

### **Cuantificación del número de receptores a estrógenos $\alpha$**

Los machos no-copuladores tuvieron un mayor número de células positivas a receptores a estrógenos  $\alpha$  en la amígdala anterior ( $t = -2.21$ , d.f.: 14,  $p = 0.04$ ) y posterior ( $t = -2.89$ , d.f.: 14,  $p = 0.01$ ) que los machos copuladores y un menor número en el área preóptica media ( $t = 3.89$ , d.f.: 14,  $p = 0.002$ ). No se observaron diferencias significativas entre los machos copuladores y no copuladores en el bulbo olfatorio accesorio capa mitral ( $t = 0.18$ , d.f.: 12,  $p = 0.85$ ) ni en núcleo de la cama de la estria terminal ( $t = -1.3$ , d.f.: 14,  $p = 0.21$ ) (Figura 12).

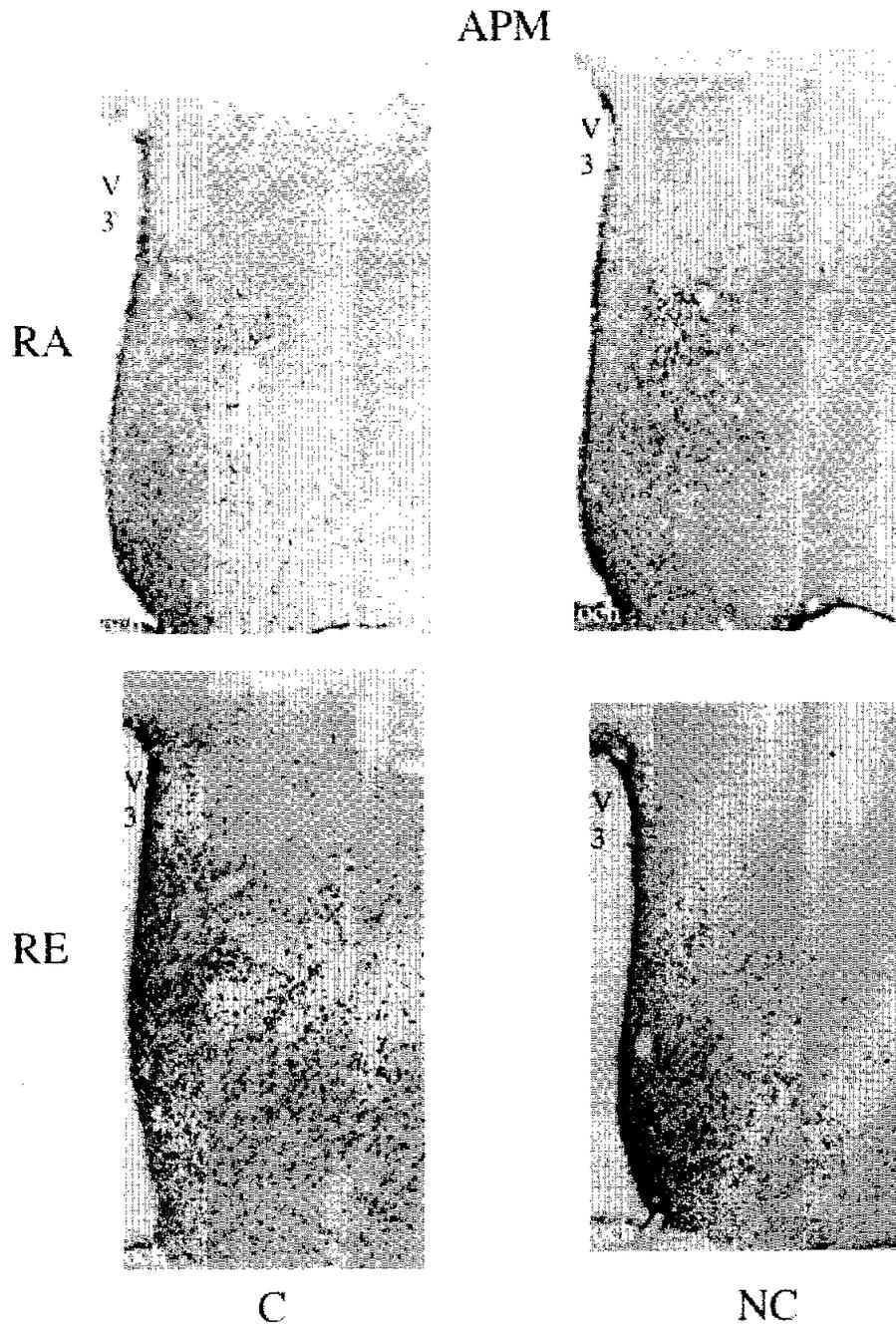
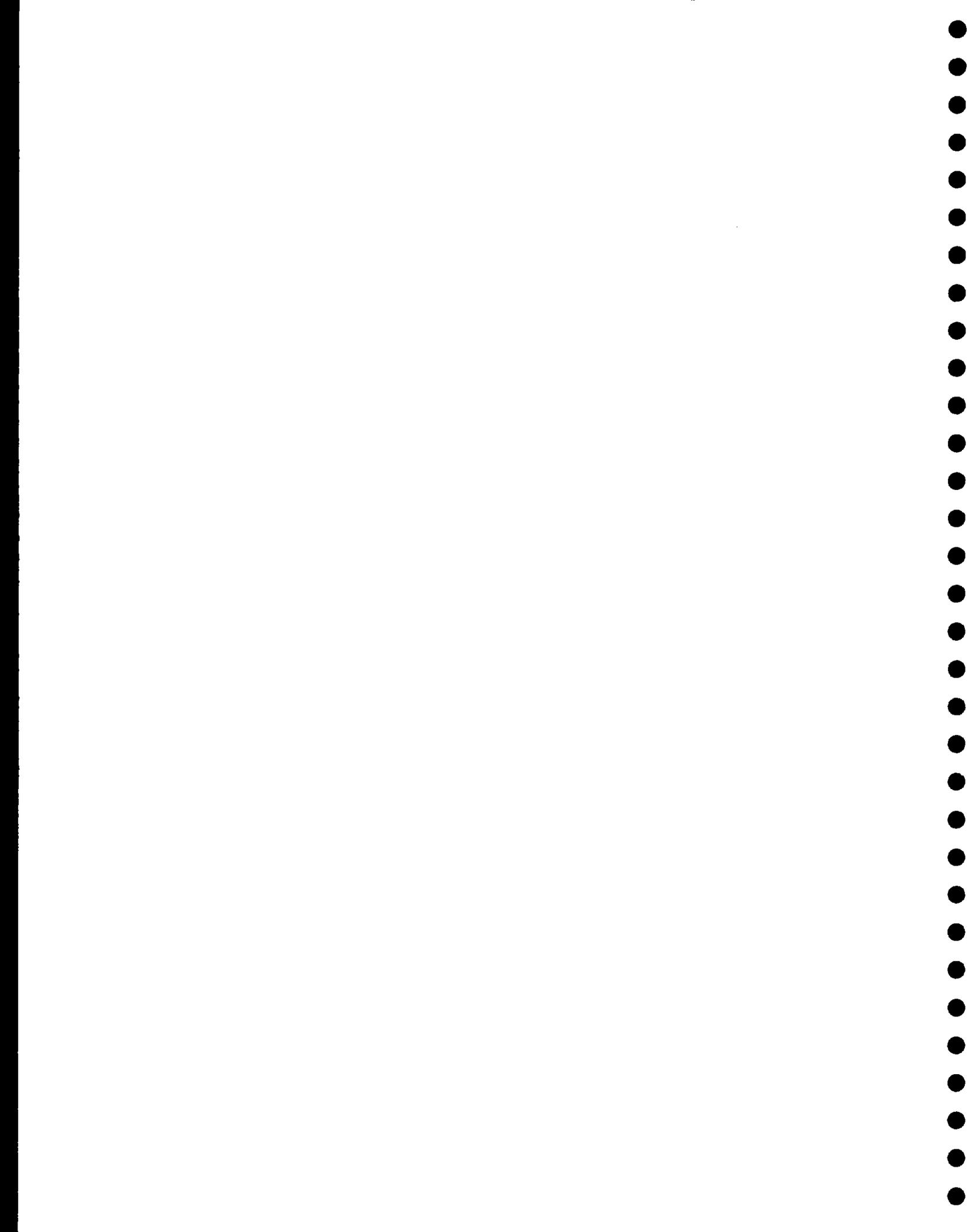


Figura 10.- Fotomicrografías representativas de células positivas a receptores a andrógenos (parte superior) y receptores a estrógenos (parte inferior) en el área preóptica media de machos copuladores y no-copuladores. Aco, comisura anterior; och, quiasma óptico y 3v tercer ventrículo.



Células positivas a RA (media ± EE)

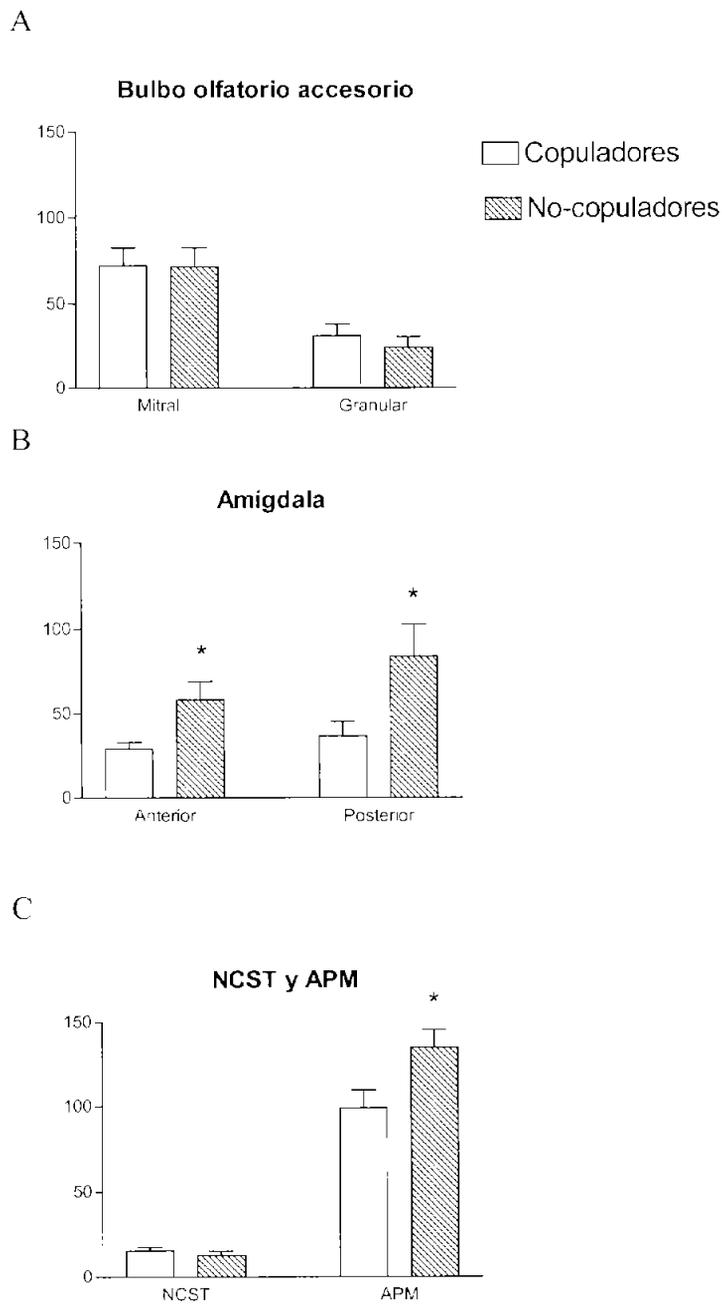


Figura 11.- Número de células inmunopositivas a receptores a andrógenos (RA) en: A) bulbo olfatorio accesorio capa mitral y granular, B) amígdala anterior y posterior y C) núcleo de la cama de la estría terminal (NCST) y área preóptica media (APM). En machos copuladores (n = 8) y no copuladores (n = 8). Los datos se expresan como la media ± error estándar (EE) y fueron analizados mediante una prueba t de Student.

Diferente de macho copulador en la misma región neuronal. \* p < 0.05.

Células positivas a RE  $\alpha$  (media  $\pm$  EE)

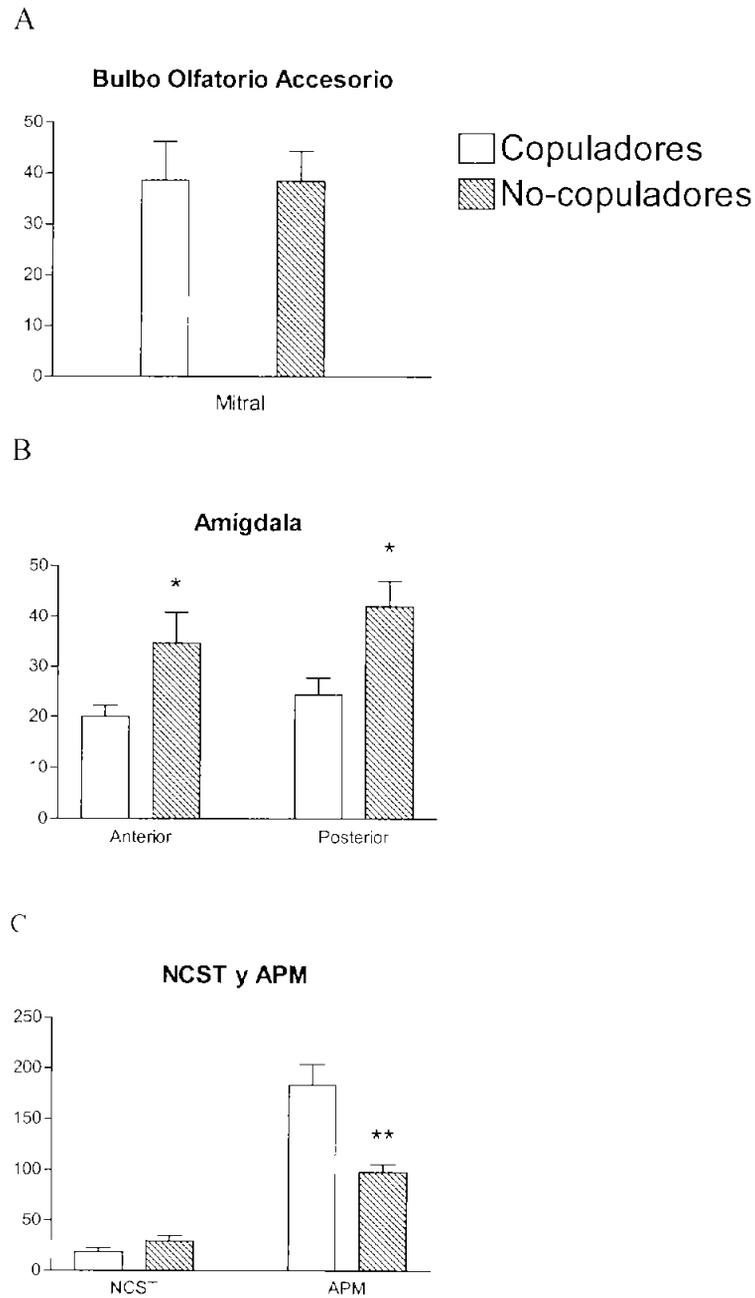


Figura 12.- Cuantificación del número de receptores a estrógenos  $\alpha$  (RE $\alpha$ ) en: A) bulbo olfatorio accesorio capa mitral, b) amígdala anterior y posterior y c) núcleo de la cama de la estría terminal (NCST) y área preóptica media (APM) de machos copuladores (n = 8) y no-copuladores (n = 8). Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar (EE) y fueron analizados mediante una prueba t de Student.

Diferente de macho copulador en la misma región neuronal. \* p < 0.05.

## e) Conclusiones

Nuestros datos muestran que los machos no-copuladores tienen un mayor número de receptores a andrógenos en el área preóptica media y en la amígdala anterior y posterior. No se encontraron diferencias en el núcleo de la cama de la estría terminal, el bulbo olfatorio accesorio capa mitral y granular. El hecho de que los receptores a andrógenos estén sobre expresados en los machos no-copuladores, sugiere que en estas estructuras los niveles de testosterona y estradiol estén elevados ya que ambas hormonas regulan positivamente al receptor de andrógenos (Lu et al., 1999; Roselly y Fasasi, 1992). Otra posibilidad es que la capacidad del receptor para unir a su ligando sea reducida y que por lo tanto se requiera de un mayor número de receptores.

En cuanto a los receptores a estrógenos tipo  $\alpha$  encontramos que los machos no-copuladores tienen un mayor número de receptores en la amígdala anterior y posterior que los machos copuladores. En el área preoptica media el número de células positivas a receptores a estrógenos tipo  $\alpha$  es menor en los machos no-copuladores que en los copuladores. Los receptores a estrógenos son regulados negativamente por la testosterona y el estradiol (Poulin et al., 1989; Simerly y Young, 1991), los receptores a estrógenos tipo  $\alpha$  probablemente están sobre-expresados en la amígdala porque los niveles de andrógenos y estrógenos estén bajos en esta estructura.

Varios grupos de investigación han descrito en la rata, cuales son las estructuras neuronales donde se localizan los receptores a estrógenos tipo  $\alpha$ . Estos trabajos demuestran que no existen receptores a estrógenos tipo  $\alpha$  en el bulbo olfatorio accesorio de animales neonatales (Zhong et al., 2001) o adultos (Shughrue et al., 1997) de ambos sexos. Sin embargo, en nuestro laboratorio encontramos que este tipo de receptores sí están presentes en el bulbo olfatorio accesorio pero únicamente en la capa mitral. Para validar estos resultados realizamos los siguientes controles: cortes en los cuales verificamos si la señal se debe a una unión inespecífica del anticuerpo primario, para lo cual las muestras se corrieron de la manera habitual solamente que no se añadió el anticuerpo primario (MC-20, Santa Cruz Biotechnology). También se incluyeron cortes que fueron incubados previamente con el péptido de bloqueo para el anticuerpo primario (MC-20p, Santa Cruz Biotechnology).

Nuestros resultados mostraron que los cortes de bulbo olfatorio accesorio en los cuales no se añadió el anticuerpo primario no se observaron células positivas, lo que sugiere que la señal no se debe a una unión inespecífica del anticuerpo primario. En los cortes seriados de bulbo olfatorio accesorio en los cuales se les agregó el péptido de bloqueo se observó una disminución de la señal, esta respuesta fue similar a la observada en otras regiones como el área preóptica media (datos no mostrados). Nuestros experimentos difieren en varios aspectos de los reportados en la literatura. Uno de los primeros anticuerpos diseñados para reconocer al receptor a estrógenos tipo  $\alpha$ , fue el anticuerpo H222 el cual solamente reconoce al receptor cuando no se encuentra unido al ligando (Clancy y Michael, 1994; Cintra et al., 1986), por lo tanto en los experimentos en los cuales se evaluó la distribución de este receptor los sujetos fueron gonadectomizados o tratados con inhibidores de la aromatasas (fadrazole) para disminuir al máximo los niveles de estradiol (Clancy y Michael, 1994). En nuestros experimentos utilizamos el anticuerpo MC-20 de Santa Cruz Biotechnology, el cual reconoce al receptor unido al ligando, lo que permite usarlo en animales gonadalmente intactos y de esta manera no incluir más variables como son la gonadectomía, la cual disminuye el número de receptores a estrógenos. En los trabajos en los cuales se detecta al ácido ribonucleico mensajero, con la finalidad de poder comparar sus resultados con los experimentos en los que se utilizan inmunohistoquímicas, gonadectomizan a los animales. Utilizando este método, no se detectó al ácido ribonucleico para los receptores a estrógenos tipo  $\alpha$  en el bulbo olfatorio accesorio (Shughrue et al., 1997; Zhong et al., 2001). Nosotros proponemos que estas discrepancias pueden deberse a que en el bulbo olfatorio accesorio la gonadectomía elimina por completo a los receptores a estrógenos  $\alpha$ , pero que en otras áreas como el área preóptica media o la amígdala en las cuales la gonadectomía solamente los disminuye.

## Capítulo 6. Discusión y conclusiones generales

En la rata para que la conducta sexual se lleve a cabo es necesario que los machos busquen una pareja sexual. Para identificar a las hembras en estro, los animales utilizan diferentes sentidos como son la audición, el olfato y la vista. Una vez que las han identificado es necesario que estén suficientemente motivados para acercarse a ellas, que coordinen adecuadamente sus movimientos para perseguirlas e inicien las conductas precopulatorias. Si estas conductas son adecuadas y por lo tanto ambos sujetos se excitan sexualmente, se inicia la copula. En esta fase el macho requiere coordinar adecuadamente sus movimientos para copular, tener una sensibilidad adecuada del pene, para tener erecciones y eyacular. Para que los machos puedan llevar a cabo todas estas conductas se requiere de una compleja interrelación entre factores fisiológicos, hormonales, neuronales y motivacionales.

Aunque la mayoría de los machos en todas las especies de mamíferos copulan cuando las condiciones son adecuadas, se ha demostrado la existencia de animales aparentemente normales los cuales no copulan aún después de ser estimulados en repetidas ocasiones con hembras en estro. Estos machos han sido denominados “no-copuladores”. Este tipo de animales se han detectado en varias especies de mamíferos como son: la cabra, el conejillo de indias, el gerbo, el hámster, la rata y el ratón (Alexander et al., 1999; Anderson, 1936; Beach, 1942; Clark et al., 1992; Harding y Feder, 1976; Perkins et al., 1992). Estos machos representan un excelente modelo natural para determinar cuales son los factores más importantes involucrados en el control de la conducta sexual masculina.

Con base en la evidencia obtenida en nuestro laboratorio proponemos que en la rata, los machos no-copuladores tienen una alteración funcional a nivel del área preóptica media (Paredes et al., 1990; Portillo y Paredes, 2003 y 2004). Sin embargo, como este tipo de ratas han sido poco estudiadas fue necesario primeramente realizar una caracterización conductual que nos permitiera descartar la participación de otros factores que pudieran estar influyendo en este déficit conductual. De esta manera en el experimento 1, demostramos que los machos no-copuladores cuando son colocados en el Smart Rod (prueba considerada como una forma de evaluar la habilidad para caminar y coordinar los movimientos finos

Whishaw et al., 2003) coordinan adecuadamente los movimientos de sus cuatro miembros para no caer del aparato. Lo que sugiere que los machos no-copuladores no tienen alteraciones en la coordinación motora fina de sus movimientos que les impida perseguir y copular con las hembras en estro. Otro aspecto que evaluamos fue si los machos no-copuladores no copulan debido a alteraciones en su sistema general de reforzamiento y que por lo tanto las conductas reforzantes como la cópula no las ejecuten debido a que no les son placenteras. Para evaluar lo anterior realizamos pruebas de preferencia de lugar condicionada en la cual evaluamos si los machos no-copuladores son capaces de asociar un estado afectivo positivo (placentero) con un ambiente determinado. Para inducir este estado a los animales se les administró morfina (Agmo y Berenfeld, 1990). En estos experimentos encontramos que en los machos no-copuladores la administración de morfina induce estados afectivos positivos de suficiente intensidad para poder ser asociados con las características ambientales de la caja. Por lo tanto, proponemos que en los machos no-copuladores una alteración en su sistema general de reforzamiento mediado por los péptidos opioides, no es la causa de su alteración conductual. Sin embargo, aunque se ha demostrado que las dosis de morfina utilizadas en este experimento, no inducen adicción por la droga ni alteraciones motoras desconocemos si corresponden a los niveles fisiológicos de los péptidos opioides liberados durante la ejecución de las conductas reforzantes como es la cópula. Finalmente es importante evaluar en futuros experimentos si los machos no-copuladores tienen concentraciones normales de péptidos opioides o de sus receptores.

En el experimento 2, demostramos que los machos no-copuladores no están conductualmente feminizados ya que al igual que los copuladores cuando son montados por otros machos, su coeficiente e intensidad de lordosis es muy bajo. Los tratamientos hormonales con benzoato de estradiol o benzoato de estradiol más progesterona incrementan la respuesta de lordosis a la misma proporción en ambos grupos de machos.

En mi proyecto de maestría demostramos que mientras los machos copuladores tienen una preferencia sexual por las hembras en estro que por los machos sexualmente activos en pruebas en las que huelen, oyen, ven e interactúan físicamente con los animales estímulo los machos no-copuladores no prefieren a ninguno de los dos sexos (Portillo y Paredes, 2003). En este trabajo (experimento 3) evaluamos si estas diferencias entre los dos

grupos de machos solamente se deben a la ejecución de la conducta sexual o a que las hembras no sean atractivas a los machos no-copuladores. Para responder lo anterior utilizamos una prueba de motivación sexual, en la cual los animales experimentales pueden oír, oler, ver pero no tener contacto físico con las hembras en estro o con los machos sexualmente activos (Agmo, 2003). En estos experimentos encontramos que mientras los machos copuladores prefieren a las hembras en estro, los no-copuladores no prefirieron a ninguno de los sujetos estímulo. Por lo que proponemos que los machos no-copuladores independientemente de que puedan copular o no con los animales estímulos, no prefieren a las hembras en estro. En la rata el olfato es el sentido más importante para reconocer a los coespecíficos (Carr et al., 1962; Gottreicht et al., 2000; Gregory et al., 1975; LeMagen, 1952). En pruebas en las que escondimos un trozo de manzana, encontramos que los machos no-copuladores no tienen alteraciones para detectar olores relacionados a la comida. Aunque desconocemos si estas ratas son capaces de discriminar entre diferentes tipos o concentraciones de olores. En las pruebas de preferencia olfatoria en las que a los machos se les permitió oler recipientes que contenían aserrín expuesto a secreciones de hembras en estro, en anestro, de machos o limpio encontramos que los machos no-copuladores al igual que los copuladores prefieren el aserrín expuesto a secreciones de hembras en estro, aunque esta fue significativamente menor en los no-copuladores. Estos resultados pueden deberse a que los machos no-copuladores tengan una menor capacidad para discriminar entre los olores de sus coespecíficos o que los olores de las hembras en estro no les sean reforzantes o atrayentes. Baum y Keverne (2002) diseñaron una estrategia para evaluar la capacidad discriminativa de ratones utilizando orina a diferentes concentraciones, empleando este método, podríamos determinar si los machos no-copuladores tienen la misma capacidad que los copuladores para discriminar olores sexualmente relevantes. Para determinar si el olor de las hembras en estro es reforzante en los machos no-copuladores se puede evaluar si este estímulo es capaz de inducir un estado afectivo positivo de suficiente intensidad como para poder ser asociado a las características ambientales de la caja de preferencia de lugar condicionada.

Varios grupos de investigación han reportado que las estructuras que integran al sistema vomeronasal incrementan su actividad neuronal cuando los machos copulan o son

estimulados con olores de hembras en estro (ver introducción del experimento 3). En los experimentos en los que cuantificamos la actividad neuronal del sistema vomeronasal en respuesta a los olores de las hembras en estro encontramos que mientras en los machos copuladores aumenta la actividad neuronal de todas las estructuras que conforman al sistema vomeronasal, en los machos no-copuladores solamente observamos un incremento en la capa mitral del bulbo olfatorio accesorio. Estos datos sugieren que en los machos no-copuladores el procesamiento neuronal de los olores de las hembras en estro aunque es normal a nivel del bulbo olfatorio accesorio es deficiente en la amígdala y el núcleo de la cama de la estria terminal. Lo cual puede generar que no llegue la información de la detección de olores sexualmente relevantes al área preóptica media y que por lo tanto esta estructura tampoco se active o que aunque la amígdala y el núcleo de la cama de la estria terminal manden la información de la detección de olores sexualmente relevantes al área preóptica media esta estructura no responda a la estimulación. El hecho de que las estructuras que conforman al sistema vomeronasal no se activen en los machos no-copuladores, puede ser una de las causas del porque estos animales no prefieren a las hembras en estro ni sus olores y por lo tanto no inicien la cópula.

Como ya se mencionó en el capítulo 2 (pág. ) la ejecución de la conducta sexual, la preferencia sexual y olfatoria así como la activación del sistema vomeronasal dependen de niveles circulantes normales de testosterona o estradiol. En el experimento 4 demostramos que los machos no-copuladores no tienen alteraciones en sus niveles plasmáticos de testosterona y estradiol. Sin embargo, desconocemos si a nivel del sistema nervioso central las concentraciones de estas hormonas o el número de sus receptores son normales. Además en futuros experimentos es importante evaluar si otras hormonas importantes en el control de la conducta sexual masculina como: la hormona liberadora de gonadotropinas, la progesterona, la prolactina entre otras son normales en los machos no-copuladores.

En cuanto a el número de receptores a andrógenos (experimento 5) encontramos que los machos no-copuladores tienen un mayor número de receptores en la amígdala y en el área preóptica media respecto de los copuladores. En la cuantificación de los receptores a estrógenos tipo  $\alpha$ , demostramos que existe un mayor número de receptores a esta hormona en la amígdala posterior de los machos no-copuladores que en los copuladores. Existen muy

pocos trabajos en los que se han cuantificado el número de receptores a estrógenos en los machos no- copuladores. Clark y colaboradores (1985) demostraron que los machos con baja actividad sexual (machos que no montaron, intromitieron ni eyacularon con hembras sexualmente receptivas en dos pruebas de conducta sexual masculina de 15 min cada una “dud”) tienen disminuidos sus niveles de receptores a estrógenos en el área preóptica media en comparación de los machos que copulan normalmente. En los carneros los machos sexualmente deficientes también tienen un número menor de receptores a estrógenos en el área preóptica media y un mayor número en la adenohipofisis en comparación con los machos copuladores cuando son expuestos a las borregas en estro (Alexander et al., 1993). Sin embargo, en estos trabajos no distinguen si los receptores que cuantificaron son del tipo  $\alpha$ ,  $\beta$  o ambos. Lo cual podría explicar las diferencias entre nuestros trabajos.

Finalmente cuantificamos la actividad de la enzima aromatasa (experimento 4) en los machos no-copuladores y copuladores en estos trabajos encontramos que los machos no-copuladores tienen una menor actividad de esta enzima en el área preóptica media pero no en otras estructuras como el núcleo de la cama de la estría terminal, el hipotálamo anterior, el núcleo ventro medial del hipotálamo y la amígdala. En los machos no-copuladores no se activa el sistema vomeronasal en respuesta a la detección de olores de hembras en estro. Sugiriendo que las deficiencias neuronales de las ratas no-copuladoras además del área preóptica media puede estar en otras estructuras como son la amígdala y el núcleo de la cama de la estría terminal. Finalmente el hecho de que la actividad de la enzima aromatasa de los machos no-copuladores se encuentre disminuida solamente en el área preóptica apoya nuestra hipótesis.

Los datos de estos experimentos apoyan la hipótesis de que los machos no-copuladores tienen una alteración funcional a nivel del área preóptica media. Los machos lesionados en esta estructura y los no-copuladores no tienen alteraciones en la coordinación motora fina de sus movimientos que les impidan acercarse y copular con las hembras en estro (Hurtazo y Paredes, 2002). Las lesiones en el área preóptica media, no alteran el sistema general de reforzamiento mediado por los péptidos opioides ya que los machos lesionados en esta estructura así como en los no-copuladores es posible inducir estados afectivos positivos mediante la administración de morfina (Hurtazo et al., 2000). Aunque el

sistema general de reforzamiento no está alterado en ningún grupo de machos su preferencia por las hembras en estro sí lo está. Tanto en pruebas de preferencia como de motivación sexual, los machos no-copuladores y los lesionados en el área preóptica media no muestran preferencia por las hembras en estro (Hurtazo y Paredes, 2000). Estas diferencias probablemente se deben a que ambos grupos de machos aunque prefieren los olores de las hembras en estro sobre los de las hembras en anestro o de los machos sexualmente activos, esta preferencia es menor a la observada en los machos copuladores (Hurtazo et al., 2000; Paredes et al., 1998; Portillo y Paredes, 2003).

Como ya se mencionó, los machos no-copuladores se han reportado en varias especies de mamíferos. En la rata, nuestros datos sugieren que este tipo de animales tienen una alteración funcional a nivel del área preóptica media. Sin embargo, la pregunta a contestar es cuáles factores pueden contribuir a establecer esta alteración. A continuación describiré brevemente algunas evidencias sobre diferentes líneas de investigación que pueden subyacer a los machos no-copuladores. Es interesante mencionar que varias de estos estudios involucran factores que pueden influir en el desarrollo normal de los machos como son el estrés prenatal, el entrecruzamiento, el ambiente hormonal influido por el sexo de los hermanos y la jerarquía social.

#### *1) Estrés prenatal*

El estrés de las madres durante la gestación influye en la diferenciación sexual del cerebro en las ratas macho gestantes, (Anderson et al., 1986; Ward, 1984) y puede contribuir al desarrollo de machos no-copuladores. Los cambios inducidos por el estrés al parecer se deben a alteraciones hormonales en la madre preñada y/o en el feto. Algunos de estos cambios son alteraciones en los niveles plasmáticos de testosterona (Coullu, 1984), incrementos en los niveles de corticotestosterona (Retana-Márquez et al., 1998; Ward y Weisz, 1984) y androstenediona (Wilke et al., 1982). Además el estrés prenatal reduce la actividad de la enzima aromatasa e incrementa la de la enzima 5- $\alpha$  reductasa, en el área preóptica media de los machos prenatalmente estresados (Reznikov et al., 2001).

Algunos efectos conductuales de este tipo de estrés incluyen alteraciones en la conducta sexual (Anderson et al., 1986; Retana-Márquez et al., 2003; Rhees et al., 1999; Ward, 1984) y cambios en las conductas motivacionales, como son las relacionadas a la ansiedad (Ader y Conklin, 1963). A nivel neuronal el estrés prenatal genera una disminución en el volumen del núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica media (Fleming et al., 1992; Kerchner y Ward, 1992; Rhees et al., 1999). Además, se ha reportado que en los machos adultos prenatalmente estresados, no se observan incrementos en la actividad neuronal (cuantificado mediante la detección de genes de respuesta temprana como c-fos) en el área preóptica media en respuesta a la exposición a hembras en estro (Humm et al., 1995).

Muchas de las características que presentan los machos prenatalmente estresados también se han observado en los machos no-copuladores de las diferentes especies de mamíferos. A continuación describiré brevemente las características comunes entre los machos prenatalmente estresados y los no-copuladores.

a) Disminución de la conducta sexual masculina.

El estrés es un factor que incrementa la proporción de machos no-copuladores. Rhees y colaboradores (1999), demostraron que mientras el 24% de los machos gestados por las hembras control no copulan cuando llegan a la edad adulta, el 60% de los machos gestados en madres estresadas (estrés restricción luz-calor) son no-copuladores. Sugiriendo que el estrés prenatal es un factor que favorece el nacimiento de machos no-copuladores. Sin embargo, es interesante mencionar que el porcentaje de machos no-copuladores gestados por madres no estresadas es mas alto en otros estudios que lo que hemos observado. Por ejemplo, Stefenick y Davidson (1987) y Damassa y colaboradores (1977) reportaron que aproximadamente del 13-16% de la población son machos no-copuladores. Mientras que en nuestro laboratorio hemos encontrado que el porcentaje de este tipo de machos varia entre el 1-2%. Estas discrepancias pueden deberse a diferencias en la cepa y el criterio para seleccionar a los machos no-copuladores. Nosotros consideramos a un macho no-copulador a aquella rata (cepa Wistar) que no monta, intromite ni eyacula en 4 pruebas

de 30 min con hembras en estro, además las hembras se reemplazan cada 10 min para excitar a los machos. El criterio de Rhees (1999) fue aquellas ratas (Sprague-Dawley) que no montaran, intromitieran o eyacularan en 2 pruebas de 30 min cambiando a la hembras en estro cada 15 min. Stefanick y Davidson consideran que los machos no-copuladores (Long Evans) son sujetos que no montaron, ni intromitieron en 8 pruebas de 15 min. Finalmente los machos no-copuladores de Damassa y colaboradores fueron animales (Long Evans) que no eyaculan en siete pruebas de 15 min, sin embargo podrían haber montado o intrometido. Por lo que la baja proporción de machos no-copuladores que obtenemos en el laboratorio puede deberse a la cepa que utilizamos y a las diferencia en el criterio utilizado para seleccionar a este tipo de animales.

b) Decrementos en los niveles plasmáticos de testosterona

Los machos prenatalmente estresados se caracterizan por tener bajos niveles de testosterona (Coullu, 1984). Este déficit también se ha observado en los gerbos no-copuladores (Clark y Galef, 1992), ya que en estos animales sus niveles sanguíneos de testosterona ( $0.77 \pm 0.12$  ng/ml) están a la mitad de lo obtenido en los gerbos copuladores ( $1.52 \pm 0.13$  ng/ml). Sin embargo, en las otras especies de mamíferos en las que se ha descrito la existencia de machos no-copuladores no se han reportado alteraciones en los niveles plasmáticos de testosterona (Alexander y col., 1999; Damassa y col., 1977). Por ejemplo, en el macho cabrío se demostró que los niveles de testosterona y de la hormona luteinizante no varían entre los machos copuladores, orientados a machos (animales que no montan a las hembras en estro y en pruebas de preferencia sexual montan a otros machos) y sexualmente deficientes (carneros que no montan o tienen latencias largas, más de 15 min, para investigar a la hembra) (Alexander et al., 1999). En los conejillo de indias que no copulan tampoco se han reportado alteraciones en sus niveles de testosterona (Harding y Feder, 1976). Finalmente, en la rata se reportó que los machos no-copuladores no tienen alteraciones en sus niveles de testosterona (Damassa et al., 1977) e incluso los tratamientos con altas dosis de esta hormona no inducen la conducta sexual masculina en todos los machos no-copuladores (Portillo y Paredes, 2003; Whalen et al., 1961). Además

demostramos que las ratas no-copuladoras tampoco tienen alteraciones en sus niveles de estradiol.

c) Disminución del volumen de los núcleos sexualmente dimórficos

El volumen del núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica media, es mayor en los machos que en las hembras, pero en los machos prenatalmente estresados es de tamaño similar al de las hembras control. Se ha propuesto que existe una correlación entre el volumen de este núcleo y la ejecución de la conducta sexual del animal. Rhees y colaboradores (1999) reportaron que en las ratas macho no-copuladoras el volumen del núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica media fue menor que el de los machos copuladores. Resultados similares fueron observados en el hipotálamo ventro medial (área de mayor volumen en las hembras que en los machos), el volumen de este núcleo fue mayor en los machos no-copuladores que en los copuladores (Rhees et al., 1999). En el carnero también se ha descrito que los machos sexualmente deficientes tienen menor densidad y tamaño neuronal en estructuras como son: el área preóptica media y la amígdala en comparación con los machos sexualmente expertos (Alexander et al., 2001).

c) Incrementos en la actividad neuronal medida por la expresión de Fos en respuesta a las hembras en estro.

En los machos prenatalmente estresados y con deficiencias en la ejecución de la conducta sexual masculina no se han observado incrementos en la actividad neuronal del área preóptica media en respuesta a las hembras en estro (Humm et al., 1995). En el presente trabajo, los machos no-copuladores expuestos a olores de hembras en estro no muestran incrementos en la actividad neuronal del área preóptica media ni en el resto de las estructuras que conforman al sistema vomeronasal. En el carnero Alexander y colaboradores (2001) demostraron que en los machos copuladores, los orientados a machos y en los sexualmente deficientes se incrementa la actividad neuronal del área preóptica media y del núcleo de la cama de la estría terminal cuando son expuestos a hembras en

estro. No se observaron incrementos en la actividad neuronal en la amígdala media y el hipotálamo ventro medial en ninguno de los grupos. Estos resultados son contradictorios a los obtenidos en las ratas no-copuladoras, sin embargo estas discrepancias pueden deberse a diferencias entre las especies y a que nuestros animales son expuestos a aserrín impregnado por secreciones vaginales de las hembras en estro por 90 min, después de este período los machos son sacrificados, mientras que en los experimentos de Alexander y colaboradores (2001) los animales son expuestos a claves auditivas, olfatorias y visuales de los animales estímulos y son sacrificados a las 4 horas. Este lapso es muy grande y puede favorecer que los machos se habitúen a estos estímulos o que el tiempo entre el estímulo y la actividad neuronal para procesarlo haya finalizado.

#### d) Actividad de la enzima aromatasa

En los machos prenatalmente estresados la actividad de la enzima aromatasa disminuye en el área preóptica media, pero no en el hipotálamo medio basal (Reznikov, 2001). En los carneros Resko (1996) demostró que en los machos orientados a machos la actividad de la enzima aromatasa en esta estructura fue menor que en los copuladores. Desafortunadamente no incluyeron en estos estudios a los animales sexualmente deficientes. En la rata macho no-copuladora demostramos que la actividad de esta enzima esta disminuida en el área preóptica media, pero no en otras regiones como: el núcleo de la cama de la estría terminal, el hipotálamo anterior, el núcleo ventro medial del hipotálamo y la amígdala.

El estrés prenatal puede ser uno de los factores que induzcan el nacimiento de machos no-copuladores, ya que ambos grupos de animales aunque no se comportan de manera idéntica presentan muchas características en común. Alexander y colaboradores (1999) sugieren que los carneros sexualmente deficientes podrían ser machos gestados por borregas estresadas. Las borregas gestantes al vivir en campo abierto pueden estar sometidas a estrés provocado por la temperatura, escasez de comida o por los depredadores y este tipo de condiciones puede resultar en machos sexualmente deficientes. Nuestras ratas aunque se encuentran en condiciones estables del bioterio, no podemos descartar que estén

expuestas algún tipo de estrés el cual puede ser generado por la manipulación de los animales cuando se les cambian sus cajas, variabilidad para suministrarles agua y comida, ruidos ambientales etc., además pueden existir hembras gestantes que sean más susceptibles a cambios ambientales ligeros, que les sean estresantes.

## *2) Entrecruzamiento*

La importancia del entrecruzamiento (inbreeding) sobre la expresión de la conducta sexual masculina fue inicialmente estudiada por Craig (1952,1954). Su experimento consistió en mantener en su laboratorio a 26 machos y 79 hembras de una cepa comercial de ratas. El entrecruzó a estas ratas y a sus descendientes hasta la generación 26 y reportó la existencia de machos que después de cohabitar con hembras no eran capaces de preñarlas. Estos animales fueron denominados “no-preñadores”. Durante el experimento describió que la proporción de machos no-preñadores (y probablemente algunos no-copuladores) incrementó al doble (aproximadamente el 80%) en la generación número 26 con respecto a la proporción de machos no preñadores observados en la colonia inicial.

## *3) Ambiente hormonal influido por el sexo de los hermanos*

En los mamíferos que se gestan en camadas los fetos pueden estar expuestos a diferentes ambientes hormonales generados por sus hermanos, este factor puede influir en su desarrollo y alterar su actividad sexual cuando los animales llegan a la edad adulta (Revisión en Ryan y Vandenberg, 2002). En el ratón y el gerbo, las hembras gestadas entre dos machos tienen mayores niveles de testosterona en su fluido amniótico y en la sangre que las gestadas entre dos hembras (Clark et al., 1992; vom Saal, 1990). Las hembras gestadas entre dos machos, cuando son adultas muestran un menor coeficiente de lordosis que las hembras gestadas entre dos hembras (Ryan y Vandenberg, 2002). En cuanto a la expresión de conducta sexual masculina, las hembras gestadas entre dos machos montan un mayor número de veces a otras hembras que las gestadas entre dos hermanas y los

tratamientos con testosterona inducen esterilidad y anoovulación más rápido en estas hembras que las control.

Los efectos de la posición intrauterina en los machos han sido ampliamente estudiada. En el gerbo se ha demostrado que los machos adultos gestados entre dos hembras tienen bajos niveles de testosterona (menos de 0.35 ng/ml) con respecto a los gestados entre dos machos (más de 3.72 ng/ml) (Clark y Galef, 1992). Los machos gestados entre dos hembras además de tener bajos niveles sanguíneos de testosterona no copulan adecuadamente. Aproximadamente el 22% de los machos gestados entre dos hembras husmean los genitales de las hembras sexualmente receptivas, pero no las persiguen, montan, intrometen ni eyaculan con ellas. Más aún, si estos machos no-copuladores cohabitan con hembras por varias semanas estas no son preñadas. Los machos gestados entre dos hermanos son más atractivos sexualmente para las hembras, preñan más animales y tienen un mayor número de descendientes por camada que los machos gestados entre una hembra y un macho (Clark y Galef, 1992). Estas observaciones demuestran que en el gerbo la posición intrauterina es un factor importante para determinar sus niveles sanguíneos de testosterona y la actividad sexual del animal cuando alcanza la edad adulta.

En la rata no se ha demostrado que la posición intrauterina modifique la conducta sexual o los niveles hormonales de los machos a la edad adulta (Hernández-Tristán et al., 1999; Zamenhof y Marthens 1989). Por lo que en esta especie, la causa de la ausencia de conducta sexual en los machos no-copuladores no se ha relacionada con la posición intrauterina del animal. Resultados similares se han observado en el carnero. Por ejemplo, en un experimento en el cual se obtuvieron 6 machos orientados a machos, dos fueron hijos únicos, dos gemelos dicigóticos y los restantes de tríos, por lo que no se ha encontrado una relación obvia entre el número y el sexo de la camada con la orientación sexual del macho a la edad adulta en el carnero (Resko et al., 1996). Esto sugiere que la causas del déficit conductual en los machos no-copuladores depende de la especie estudiada, ya que en el gerbo la posición intrauterina es un factor fundamental mientras que en el carnero y la rata parece no serlo.

#### *4) Jerarquía social*

En el mono, se ha propuesto que los machos con jerarquía social baja tienen un acceso restringido a la comida y a las hembras receptivas y que por lo tanto los machos subordinados no despliegan conductas reproductivas como lo hacen los animales dominantes y sus niveles plasmáticos de hormona luteinizante y testosterona son menores que los de los machos dominantes (Keverne, 1979). Sin embargo, este factor no parece ser determinante en el déficit conductual de los machos no-copuladores. En los carneros, los machos sexualmente deficientes son igual de agresivos que los machos copuladores cuando tienen un acceso limitado a la comida (Erhard et al., 1998). La rata no es una especie en la que se establezcan claras jerarquías sociales. Además, durante las pruebas de conducta sexual masculina cada macho es colocado individualmente con una hembra en estro, sin la presencia de otros machos con los que pueda competir y aun en estas condiciones no copulan. Por lo que proponemos que el déficit conductual en las ratas macho no-copuladoras no se debe a la jerarquía social del animal.

#### *5.- Neurotransmisores y conducta sexual masculina*

##### *a) Dopamina*

En los machos prenatalmente estresados, los sujetos que no copulan no liberan dopamina en el núcleo acumbens en respuesta a la exposición a hembras en estro, los machos control y los estresados prenatalmente que son capaces de copular incrementan sus niveles de dopamina cuando son estimulados por una hembra en estro colocada detrás de una malla y esta liberación incrementa si se permite que copulen (Wang et al., 1995). Cambios en la liberación de dopamina también se han reportado en otra estructura importante en el control de la conducta sexual masculina como es el área peróptica media, Sato y colaboradores (1995) demostraron que los machos que no copulan no liberan dopamina en esta área.

Se ha reportado que la gonadectomía reduce en terminos generales la capacidad del macho para copular. Sin embargo, los machos gonadectomizados que continuan copulando incrementa su liberación de dopamina en el APM en respuesta a hembras inaccesibles, no asi los machos que cesan de copular (Hull et al., 1995). Estos datos sugieren que la liberación de dopamina en el núcleo acumbens como en el área preóptica media es importante en el control de la conducta sexual masculina.

Los machos no-copuladores pueden ser animales que durante su desarrollo embrionario tuvieron alguna alteración que modificó la expresión de genes que regulan la expresión de la conducta sexual masculina en las áreas del cerebro que controlan esta conducta. Por lo anterior en el futuro mediante la técnica de microarreglos se pretende identificar genes de expresión diferencial en la amígdala, región preóptica e hipotálamo de machos copuladores y no-copuladores, los genes que primeramente se evaluarían serían los que codifican para la enzima aromatasa, para receptores a andrógenos y estrógenos, para neurotransmisores como la dopamina y péptidos opioides.

## Referencias

- Ader R, Conklin RM. Handling of pregnant rats: Effects on emotionality of their offspring. *Science*. 142:411-412. 1963.
- Agmo A. Sexual motivation-an inquiry into events determining the occurrence of sexual behavior. *Behav. Brain Res.* 105:129-150. 1999.
- Agmo A. Unconditioned sexual incentive motivation in the male norway rat. *J. Comp. Psychol.* 117:3-14. 2003.
- Agmo A, Berenfeld R. Reinforcing properties of ejaculation in the male rat: role of opioids and dopamine. *104:177-182.* 1990.
- Agmo A, Federman I, Navarro V, Padua M, Velásquez G. Reward and reinforcement produced by drinking water: role of opioids and dopamine receptor subtypes. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 46:183-194. 1993.
- Agmo A, Gómez M. Sexual reinforcement is blocked by infusion of naloxone into the medial preoptic area. *Behav. Neurosci.* 107:812-818. 1993.
- Agmo A, Marroquín E. Role of gustatory and post ingestive actions of sweeteners in the generation of positive effects as evaluated by place preference conditioning. *Appetite.* 29:269-289. 1997.
- Agmo A, Paredes RG. Opioids and sexual behavior in the male rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 30:1021-1034. 1988.
- Agmo A, Paredes RG, Contreras JL. Opioids and sexual behavior in the male rabbit: the role of central and peripheral opioid receptors. *J Neural Transm Gen Sect.*97:211-23.1994.
- Agmo A, Paredes RG, Fernández H. Differential effects of GABA transaminase inhibitors on sexual behavior, locomotor activity, and motor execution in the male rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 28:47-52. 1987.
- Albonetti ME, Farabollini F, Dessi-Fulgheri F. The acquisition of social dominance in female rabbits. *Monito. Zool. Ital.* 22:465-476. 1988.
- Alexander BM, Rose JD, Stellflug JN, Fitzgerald JA, Moss GE. Fos-like immunoreactivity in brain regions of domestic rams following exposure to rams or ewes. *Physiol. Behv.* 73:75-80. 2001.
- Alexander BM, Rose JD, Stellflug JN, Fitzgerald JA, Moss GE. Low-sexually performing rams but not male-oriented rams can be discriminated by cell size in the amygdala and preoptic area: a morphometric study. *Behav. Brain Res.* 119:15-21. 2001.
- Alexander BM, Stellflug JN, Rose JD, Fitzgerald JA, Moss GE. Behavior and endocrine correlates related to exposure of heterosexual, low-performing and male-oriented domestic rams to rams and ewes in estrus. *J. Anim. Sci.* 77:1869-1864. 1999.
- Anderson EE. Consistency of tests of copulatory frequency in the male albino rat. *J. Comp. Pshychol.* 21:447-459.1936.
- Anderson RH, Fleming DE, Rhees RW, Kinghorn E. Relationships between sexual activity, plasma testosterone, and the volumen of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in prenatally stressed and non-stressed rats. *Brain Res.* 370:1-10. 1986.
- Bardo MT, Rowlett JK, Harris MJ. Conditional place preference using opiate and stimulant drug: a meta-analysis. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 19:39-51. 1995.

- Barfield RJ, Wilson C, McDonald PG. Sexual behavior: Extreme reduction of postejaculatory refractory period by midbrain lesion in male rats. *Science*. 189:147-149. 1975.
- Bargmann CI. Olfactory receptors, vomeronasal receptors, and the organization of olfactory information. *Cell*. 90:585-587. 1997.
- Bakker J. Sexual differentiation of the neuroendocrine mechanisms regulating mate recognition in mammals. *J. Neuroendocrinology*. 15:615-625. 2003.
- Bakker J, Baum MJ, Slob AK. Neonatal inhibition of brain estrogen formation and later neural Fos responses to chemosensory stimulation in the male rat. *Neuroscience*. 74:251-260. 1996.
- Bakker J, Honda S, Harada N, Balthazar J. Sexual partner preference requires a functional aromatase (Cyp 19) gene in male mice. *Horm. Behav.* 42:158-171. 2002.
- Bakker J, Van Ophemert J, Slob KA. Sexual differentiation of odor and partner preference in the rat. *Physiol. Behav.* 60:489-494. 1996.
- Barfield RJ, Geyer LA. The ultrasonic postejaculatory vocalization and the postejaculatory refractory period of the male rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 88:723-734. 1975.
- Bargmann CI. Olfactory receptors, vomeronasal receptors, and the organization of olfactory information. *Cell*. 90:585-587. 1997.
- Barlow NJ, Foster PM. Pathogenesis of male reproductive tract lesions from gestation through adulthood following in utero exposure to Di(n-butyl) phthalate. *Toxicol Pathol.* 31:397-410. 2003.
- Barros DM, Izquierdo LA, Medina, Izquierdo I. Pharmacological findings contribute to the understanding of the main physiological mechanisms of the memory retrieval. *Curr Drug target CNS Neurol Disord.* 2:81-94.
- Baum MJ. Differentiation of coital behavior in mammals: a comparative analysis. *Neurosc. Biobehav. Rev.* 3:265-284. 1979.
- Baum MJ. Neuroendocrinology of sexual behavior in the male. En: *Behavioral endocrinology*. Bakker J, Breedlove SM, Crews D (Eds.) USA. Pp. 97-139.
- Baum MJ, Brand T, Ooms MP, Vreburg JTM, Slob AK. Immediate postnatal rise in whole body androgen content in male rats: correlation with increased testicular content and reduced body clearance of testosterone. *Biol. Reprod.* 38:980-986. 1988.
- Baum MJ, Keverne EB. Sex difference in attraction thresholds for volatile odors from male and estrous female mouse urine. *Horm. Behav.* 41:213-219. 2002.
- Baum MJ, Tobet SA, Starr MS, Bradshaw WG. Implantation of dihydrotestosterone propionate into the lateral septum or medial amygdala facilitates copulation in castrated male rats given estradiol systemically. *Horm. Behav.* 16:208-223. 1982.
- Baum MJ, Vreburg JTM. Copulation in castrated male rats following combined treatment with estradiol and dihydrotestosterone. *Science*. 182:283-285. 1973.
- Baum MJ, Woutersen PJA, Slob AK. Sex difference in whole-body androgen content in rats on fetal days 18 and 19 without evidence that androgen passes from males to females. *Biol. Reprod.* 44:747-751. 1991.
- Beach FA. Analysis of factors involved in the arousal, maintenance and manifestation of sexual excitement in

male animals. *Physiol. Med.* 4:173-198.1942.

Beach FA. Cerebral and hormonal control of reflexive mechanisms involved in copulatory behavior. *Physiol. Rev.* 47:289-316. 1967.

Beach FA, Holz-Tucker AM. Effects of different concentrations of androgen upon sexual behavior in castrated male rats. *J. Com. Physiol. Psychol.* 42: 433-453. 1949.

Beach FA, Pauker RS. Effects of castration and subsequent androgen administration upon mating behavior in the male hamster (*Cricetus auratus*). *Endocrinology.* 45:211-221. 1949.

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

Benjamin RM, Jackson JC, Golden GT, West CHK. Sources of olfactory inputs to opossum mediadorsal nucleus identified by horseradish peroxidase and autoradiographic methods. *J. Comp. Neurol.* 207:358-368. 1982.

Beyer C. Neuroendocrine mechanisms in sexual behavior. En: *Subcellular Mechanisms in Reproductive Neuroendocrinology.* F Naftolin, KJ Rayan, IJ Davies (Eds.). Elsevier, Amsterdam. Pp:471-484. 1976.

Bhasin S. Androgens, effects in mammals. En: *Encyclopedia of reproduction.* E Knobil, JD Neill (Eds.). Academic Press, San Diego USA. Pp 197-206. 1998.

Bialy M, Sachs BD. Androgen implants in medial amygdala briefly maintain noncontact erection in castrated male rats. *Soc. Behav. Neuroendocrinology.* Abstr. 4,268.

Blaustein JD, Erskine MS. Feminine sexual behavior: Cellular integration of hormonal and afferent information in the rodent brain. En: *Hormones, brain and behavior.* Pfaff, D.W, Arnold AP, Etgen, A.M., Fahrbach, S.E., Rubin, R.T. (Eds.). Academic Press, San Diego, California. Pp: 139-214. 2002.

Boden AG, Harris MC, Parkes MJ. The preoptic area in the hypothalamus is the source of the additional respiratory drive at raised body temperature in anesthetized rats. 2000.

Brand T, Kroonen J, Mos J, Slob Ak. Adult partner preference behavior in male rats affected by perinatal endocrine manipulations. *Horm. Behav.* 25:323-341. 1991.

Bressler SC, Baum MJ. Sex comparison of neuronal FOS immunoreactivity in the rat vomeronasal projection circuit after chemosensory stimulation. *Neuroscience.* 71:1063-1072. 1996.

Brookhart JM, Dey FL. Reduction of sexual behavior in male guinea-pigs by hypothalamic lesions. *Am. J. Physiol.* 133:551-554.1941.

Brouette-Lahlou I, Godinot F, Vernet-Maury E. The mother rat's vomeronasal organ is involved in detection of dodecyl propionate, the pup's preputial gland pheromone. *Physiol Behav.* 66:427-36. 1999.

Brown TJ, Hochberg RB, Zielinski JE, MacLusky NJ. Regional sex differences in cell nuclear estrogen-binding capacity in the rat hypothalamus and preoptic area. *Endocr.* 123:1761-1770. 1988.

Brown TJ, MacLusky NJ, Shanabrough M, Naftolin F. Comparison of age- and sex related changes in cell nuclear estrogen-binding capacity and progestin receptor induction in the rat brain. *Endocr.* 126:2965-2972. 1990.

Bullit E. Expresión of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J. Comp. Neurol.* 319:517-530. 1990.

Caggiula AR, Antelman SM, Zigmond MS. Ineffectiveness of sexually arousing stimulation after hypothalamic lesions in the rat. *Physiol. Behav.* 12:313-316. 1974.

Cain DP. The role of the olfactory bulb in limbic mechanisms. *Psychol. Bull.* 8:654-671. 1974.

Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW. Connections of the posterior nucleus of the amygdala. *J. comp. Neurol.* 324:143-179. 1992.

Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW. Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: A PHAL study in the rat. *J. comp. Neurol.* 360:213-245. 1995.

Carr WJ, Loeb LS, Dissinger ML. Responses of rats to sex odors. *J. Com. Physiol. Psychol.* 59:370-377. 1965.

Carr WJ, Loeb LS, Wylie NR. Responses to feminine odors in normal and castrated male rats. *J. Com. Physiol. Psychol.* 62:336-338. 1966.

Carr WJ, Solberg B, Pfaffmann C. The olfactory threshold for estrous female urine in normal and castrated male rats. *J. Com. Physiol. Psychol.* 55:415-417. 1962.

Ceccatelli S, Villar MJ, Goldstein M, Hökfelt T. Expression of c-fos immunoreactivity in transmitter-characterized neurons after stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:9569-9573. 1989.

Celotti F, Melcangi RC, Martini L. The 5-reductase in the brain : molecular aspects and relation to brain function. *Fron. Neuroendo.* 13:163 -215. 1992.

Chiba T, Murata Y. Afferent and efferent connections of the medial preoptic area in the rat: a WGA-HRP study. *Brain. Res. Bull.* 14:261-272. 1985.

Cintra A, Fuxe K, Harfstrand A, Agnati LF, Miller LS, Greene JL, Gustafsson JA. On the cellular localization and distribution of estrogen receptors in the rat tel- and diencephalon using monoclonal antibodies to human estrogen receptor. *Neurochem Int.* 8:587-595. 1986.

Clancy AN, Michael RP. Effects of testosterone and aromatase inhibition on estrogen receptor like immunoreactivity in male rat brain. *Neuroendocrinology.* 59:552-560. 1994.

Clark AS, Davis LA, Roy EJ. A possible physiological basis for the dud-stud phenomenon. *Horm Behav.* 19: 227-30. 1985.

Clark MM, Galef BG. Why some male Mongolian gerbils may help at the nest: testosterone, asexuality and alloparenting. *Anim. Behav.* 59:801-806. 2000.

Clark MM, vom Saal FS, Galef BG Jr. Intrauterine positions and testosterone levels of adult male gerbils are correlated. *Physiol Behav.* 51:957-60. 1992.

Claro F, Segovia S, Guillamón A, Abril A. Lesions in the medial posterior region of the BST impair sexual behavior in sexually experienced and inexperienced male rats. *Brain Res. Bull.* 36:1-10. 1995.

Collu R, Gibb W, Ducharme GR. Effects of stress on the gonadal function. *J. Endocrinol. Invest.* 7:529-537. 1984.

Conrad ICA, Pfaff DW. Efferents from medial basal forebrain and hypothalamus in the rat. I. An autoradiographic study of the medial preoptic area. *J. Comp. Neurol.* 169:185-220. 1976.

- Cooke BM, Breedlove SM, Jordan CL. Both estrogen receptors and androgen receptors contribute to testosterone-induced changes in the morphology of the medial amygdala and sexual arousal in male rats. *Horm. Behav.* 43:336-346.2003.
- Coolen LM, Peters IJP, Veening JG. Distribution of fos immunoreactivity following mating versus anogenital investigation in the male rat brain. *Neuroscience.* 77:1151-1161. 1997.
- Cooke BM, Hegstrom CD, Villeneuve LS, Breedlove SM. Sexual differentiation of the vertebrate brain: principles and mechanisms. *Front Neuroendocrinol.* 1998. 19:323-362.
- Corbier P, Kerdellhue B, Picon R, Roffi J. Changes in testicular weight, serum gonadotropin secretion, and testosterone levels before, during, and after birth in the perinatal rat. *Endocrinology.* 103: 1985-1999. 1978.
- Craig JV. A physiological basis for male infertility and the predictability of body weight in rats obtained by various mating system. 72pp. Tesis de doctorado. 1952.
- Craig JV, Casida LE, Chapman AB. Male infertility associated with lack of libido in the rat. *The American Naturalist.* 84:365-372. 1954.
- Curtis JT, Liu Y, Wang Z. Lesions of the vomeronasal organ disrupt mating-induced pair bonding in female prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Brain Res.* 901:167-174. 2001.
- Damassa DA, Smith ER, Tennent B, Davidson JM. The relationship between circulating testosterone levels and male sexual behavior in rats. *Horm. Behav.* 8:275-286. 1977.
- Davis PG, Chaptal CV, McEwen BS. Independence of the differentiation of masculine and feminine sexual behavior in rats. *Horm. Behav.* 12:12-19. 1979.
- de Jonge FH, Oldenburger WP, Louwse AL, van de Poll NE. Changes in male copulatory behavior after sexual exciting stimuli: effects of medial amygdala lesions. *Physiol. Behav.* 52:327-332. 1992.
- De Olmos J, Hardy H, Heimer L. The afferent connections of the main and accessory olfactory bulb formations in the rat: An experimental HRP-study. *J. Comp. Neurol.* 181:213-224. 1978.
- De Vries GJ, Simerly RB. Anatomy, development, and function of sexually dimorphic neural circuits in the mammalian brain. 137-190. 2002.
- Dominguez J, Riolo JV, Xu Z, Hull EM. Regulation by the medial amygdala of copulation and medial preoptic dopamine release. *J. Neurosci.* 21:349-355. 2001.
- Dominguez-Salazar E, Portillo W, Baum JM, Bakker J, Paredes RG. Effects of prenatal androgen receptor antagonist or aromatase inhibitor on sexual behavior, partner preference and neuronal Fos response to estrous female odors in the rat accessory olfactory system. *Physiol. Behav.* 75:337-346. 2002.
- Dong HW, Petrovich GD, Swanson LW. Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Brian Res Brain Res Rev.* 38:192-246.2001.
- Duarte C, Lefebvre C, Chaperon F, Hamon M, Thiebot MH. Effects of a dopamine D(3) receptor ligand, BP 897, on acquisition and expression of food-, morphine-, and cocaine-induced conditioned place preference, and food-seeking behavior in rats. *Neuropsychopharmacology.* Nov 28:1903-15. 2003
- Edwards DA, Griffis KT, Tardivel C. Olfactory bulb removal: effects on sexual behavior and partner preference in male rats. *Physiol. Behav.* 48:447-450. 1990.
- Edwards DA, Walter B, Liang P. Hypothalamic and olfactory control of sexual behavior and partner

- preference in male rats. *Physiol. Behav.* 60:1347-1354. 1996.
- Emery DE, Sachs BD. Ejaculatory pattern in female rats without androgen treatment. *Science.* 190:484-486. 1975.
- Emery DE, Sachs BD. Copulatory behavior in male rats with lesions in the bed nucleus of the stria terminalis. *Physiol. Behav.* 17:803-806. 1976.
- Erhard II, Price EO, Dally MR. Competitive ability of rams selected for high and low levels of sexual performance. *Anim. Sci.* 66:403-408. 1998.
- Feder H, Naftolin F, Ryan KJ. Male and female sexual responses in male rats given estradiol benzoate and 5-androstan-17 $\beta$ -lo-3-one propionate. *Endocrinology.* 94:136-141. 1974.
- Fewell GD, Meredith M. Experience facilitates vomeronasal and olfactory influence on Fos expression in medial preoptic area during pheromone exposure or mating in male hamsters. *Brain Res.* 941:91-106. 2002.
- Firestein S. How the olfactory system makes sense of scents. *Nature Rev.* 413:211-218. 2001.
- Fisher CR, Graves KH, Parlow AF, Simpson ER. Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp 19 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:6965-6970. 1998.
- Fleming A, Vaccarino F, Tambosso L, Chee Ph. Vomeronasal and olfactory system modulation of maternal behavior in rat. *Science.* 203:372-374. 1979.
- Fleming DE, Kinghorn EW, Rhees RW, Anderson RH, Smythe F. Biological predictors of masculine sexual behavior in prenatally stressed and nonstressed rats. *Bull. Psychon. Soc.* 30:513-514. 1992.
- Fuller GN, Burger PC. Nervus terminalis (cranial nerve zero) in the adult human. *Clin Neuropathol.* 9: 279-283. 1990.
- García P, Paredes RG. Dopamine antagonist do not block conditioned place preference induced by paced mating behavior in female rats. Aceptado.
- Giantonio GW, Lund NL, Gerall AA. Effect of diencephalic and rhinencephalic lesions on the male rat's sexual behavior. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 73:38-46. 1970
- Georges F,W. Androgen metabolism in the prostate of the finasteride-treated, adult rat: a posible explanation for the differential action of testosterone and 5  $\alpha$ -dihidrotestosterone during development of the male urogenital tract. *Endocrinology.* 138: 871-877. 1997
- Georges F, Aston-Jones G. Activation of ventral tegmental area cells by the bed nucleus of the stria terminalis: a novel excitatory amino acid input to midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* 22:5173-5187. 2002.
- Ginton A, Merari A. Long range effects of MPOA lesion on mating behavior in the male rat. *Brain. Res.* 120: 158-163. 1977.
- Giantonio GW, Lund NL, Gerall AA. Effect of diencephalic and rhinencephalic lesions on the male rat's sexual behavior. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 73:38-46. 1970.
- Giovannelli L, Bloom FE. C-Fos protein expression in the rat subformical organ following osmotic stimulation. *Neurosci. Lett.* 139:1-6. 1992.
- Gottreich A, Zuri I, Barel S, Hammer I, Terkel J. Urinary testosterone levels in the male blind male rat (*Spalax ehrenbergi*) affect female preference. *Physiol. Behav.* 69:309-315. 2000.

- Gréco B, Edwards DA, Zumpe D, Michael RP, Clancy AN. Fos induced bby mating or noncontact social interactions is colocalized with androgen receptors in neurons within the forebrain, midbrain and lumbosacral spinal cod of male rats. *Hormo. Behav.* 33:125-138.1998.
- Greenberg ME, Ziff EB. Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature* 311:433-438.1984.
- Gregory E, Engel K, Pfaff D. Male hamster preference for odors of female hamster vaginal discharges: studies of experimental and hormonal determinants. *J. Comp. Physiol.* 89:442-446. 1975.
- Grunt JA, Young WC. Consistency of sexual behavior patterns in individual male guinea pigs following castration and androgen therapy. *J. comp. Physiol. Psicol.* 46:138-144.1953.
- Guan X, Blank J, Dluzen D. Depletion of olfactory bulb norepinephrine by 6-OHDA disrupts chemical cue but not social recognition responses in male rats. *Brain Res.* 622: 51-7. 1993.
- Guillamón A, Segovia S. Sexual dimorphism in the CNS and the role of steroids. In *CNS neurotransmitters and neuromodulators neuroactive steroids*. T. W. Stone ed. Pp.127-152. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Guillamon A, Segovia S. Sex differences in the vomeronasal system. *Brain Res Bull.* 44: 377-82. 1997.
- Guillot PV, Chapouthier G. Intermale aggression, GAD activity in the olfactory bulbs and Y chromosome effect in seven inbred mouse strains. *Behav Brain Res.* 90: 203-6. 1998.
- Halpern M. The organization and function of the vomeronasal system. *Ann. Rev. Neurosci.* 10:325-362. 1987.
- Handa RJ, Roselli CE, Horton L, Resko JA. The quantitative distribution of cytosolic androgen receptor in microdissected areas of the male rat brain: Effects of estrogen treatment. *Endocrinology.* 121:233-240. 1987.
- Hansen S, Kohler C, Goldstein M, Steinbusch HVM. Effects of ibotenic acid-induced neuronal degeneration in the medial preoptic area and the lateral hypothalamic area on sexual behavior in the male rat. *Brain. Res.* 239:213-232. 1982.
- Harding CF, Feder HII. Relation between individual differences in sexual behavior and plasma testosterone levels in the guinea pig. *Endocrinology.* 98:1198-1205. 1976.
- Hardy DF, Debold JF. Effects of coital stimulation upon behavior of the female rat. *J. Comp. Physiol. Phychol.* 78:400-408. 1972.
- Harlan RF. Regulation of neuropeptide gene expresión by steroid hormones. *Mol. Neurobiol.* 2:183-200. 1988.
- Harris VS, Sachs BD. Copulatory behavior in male rats following amygdaloid lesions. *Brain. Res.* 86:514-518. 1975.
- Heeb HM, Yahr P. c-fos immunoreactivity in the sexually dimorphic area of the hypothalamus and related brain regions of male gerbils after exposure to sexual-related stimuli or performance of specific sexual behaviors. *Neuroscience.* 72:1049-1071. 1996.
- Heeb MM, Yahr P. Cell-body lesions of the posterodorsal preoptic nucleus or posterodorsal medial amygdala, but not the parvicellular subparafascicular thalamus, disrupt mating in male gerbils. *Physiol. Behav.* 68:317-331. 2000.
- Heimer L, Larsson K. Impairment of mating behavior in male rats following lesions in the preoptic-anterior

- hypothalamic continuum. *Brain. Res.* 3:248-263. 1966/1967.
- Hennessey AC, Wallen K, Edwards DA. Preoptic lesions increased the display of lordosis by male rats. *Brain Res.* 370:21-28. 1986.
- Hernández-Tristán R, Arévalo C, Canals S. Effect of prenatal uterine position on male and female rats sexual behavior. *Physiol Behav.* 67:401-408. 1999.
- Herrera DG, Robertson HA. Activation of c-fos in the brain. *Prog. Neurobiol.* 50:83-107. 1996.
- Hetta J, Meyerson BJ. Sexual motivation in the male rat: a methodological study of sex specific orientation and the effects of gonadal hormones. *Acta. Physiol. Scand.* 453:1-68. 1978.
- Hillarp NA, Olivercrona H, Silfverskiöld W. Evidence for the participation of the preoptic area in male mating behavior. *Experientia.* 10:224-227.1954.
- Hines M, Allen LS, Gorski RA. Sex differences in subregions of the medial nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. *Brain Res.*579:321-326.1992.
- Hipakka R, Liao S. Dihydrotestosterone. En: *Encyclopedia of reproduction.* E Knobil, JD Neill (Eds.), Academic Press, San Diego USA. Pp 872-879. 1998.
- Hlišák Z. Precopulatory behavior of laboratory rat: an ethological approach. *Activi. Nerv. Sup.* 28: 108-116. 1986.
- Hlinak Z. Precopulatory behaviour of male rats: developmental aspects and dependence on female's solicitation. *Act Nerv Super (Praha).* 32:264-82. 1990.
- Hlišák Z, Madlafousek J, Spinka M. Transition from precopulatory to copulatory behavior in male rats with lesions in medial preoptic area: dependence on precopulatory pattern of female. *Activi. Nerv. Sup.* 29: 257-262. 1987.
- Honda S, Harada N, Ito S, Takagi Y, Maeda S. Disruption of sexual behavior in male aromatase-deficient mice lacking exons 1 and 2 of the *cyp 19* gene. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 252:445-449.1998.
- Hull EM, Meisel RL, Sachs BD. Male sexual behavior, in: Pfaff, D.W., Arnold AP, Etgen, A.M., Fahrbach, S.E., Rubin, R.T. (Ed.), *Hormones, brain and behavior*, Academic Press, San Diego, California, pp. 1-32. 2002.
- Humm JL, Lambert KG, Kinsley CH. Paucity of c-fos expression in the medial preoptic area of prenatally stressed male rats following exposure to sexually receptive females. *Brain Res. Bull.* 37:363-368. 1995.
- Hull EM, Du J, Lorrain DS, Matuszewich L. Testosterone, preoptic dopamine, and copulation in male rats. *Brain Res Bull.* 44:327-333. 1997.
- Hurtazo HA, Dominguez-Salazar E, Paredes RG. Olfactory preference and conditioned place preference in male rats with lesions of the medial preoptic area. Abstracts of the 30<sup>th</sup> Annual Meeting of Society of Neuroscience; 2000. Abstract 77.22.
- Hurtazo HA, Paredes RG. Análisis de la preferencia olfatoria y el condicionamiento de lugar en ratas machos con lesiones en el área preóptica media del hipotálamo anterior (APM/HA). Tesis de licenciatura.
- Hurtazo HA, Paredes RG. Evaluación del funcionamiento del sistema vomeronasal por Fos en ratas macho con lesiones del área preóptica media del hipotálamo anterior (APM/HA). Tesis de Maestría.

- Ichikawa M. Synaptic mechanisms underlying pheromonal memory in vomeronasal system. *Zoo. Science*. 20:687-695. 2003.
- Imperato-McGinley J, Sánchez RS, Spencer JR, Yee B, Vaughan ED. Comparison of the effects of the 5  $\alpha$ -reductase inhibitor finasteride and the antiandrogen flutamide on prostate and genital differentiation: dose-response studies. *Endocrinology*. 131:1149-1156. 1992.
- Ingersoll DW. Role of the vomeronasal organ in murine priming and signaling hemocommunication system. *Dissert. Abst.* 41B:3215-3225. 1981.
- Jemiolo B, Harvey S, Novotny M. Promotion of the Whitten effect in female mice by synthetic analogs of male urinary constituents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 4576-9. 1986.
- Kakeyama M, Yamanouchi K. Lordosis in male rats: The facilitatory effect of dorsal raphe nucleus lesion. *Physiol. Behav.* 51:181-184. 1992.
- Kakeyama M, Yamanouchi K. Lordosis in male rats: Effect of dorsal raphe nucleus cuts. *Horm. Behav.* 32:60-67. 1997.
- Kamat A, Hinshelwood MM, Murry BA, Mendelson CR. Mechanism in tissue-specific regulation of estrogen biosynthesis in humans. *Trends. Endocr. Metab.* 13:122-127. 2002.
- Kashiwayanagi M. Molecular recognition and intracellular transduction mechanisms in olfactory and vomeronasal system. In: Pfaff DW, Arnold AP, Etgen AM, Fahrbach SE, Rubin RT (Eds.). *Hormones, brain and behavior*. San Diego. Academic Press. Pp 1-32. 2002.
- Kelliher KR, Baum MJ. Effect of sex steroids and coital experience on ferrets' preference for the smell, sight and sound of conspecifics. *Physiol. Behav.* 76, 1-7. 2002.
- Kelliher KR, Chang YM, Wersinger SR, Baum MJ. Sex differences and testosterone modulation of pheromone-induced neuronal Fos in the ferret's main olfactory bulb and hypothalamus. *Biol. Reprod.* 59: 1454-1463. 1998.
- Kerchner M, Ward IL. SDN-POA volume in the male rats is decreased by prenatal stress but is not related to ejaculatory behavior. *Brain Res.* 581-244-251. 1992.
- Keverne EB. Sexual and aggressive behavior in social groups of talapoin monkeys. In Porter R, Whelan J (Eds.) *Sex, hormones and behavior*. Ciba Found Symp. 63. pp. 271-286. 1979.
- Keverne EB. The vomeronasal organ. *Science*. 286. 716-723. 1999.
- Keverne EB. Mammalian pheromones: from genes to behavior. *Curr Biol.* 12:R807-R809. 2002.
- Kindon HA, Baum MJ, Paredes RG. Medial preoptic/anterior hypothalamic lesions induce a female-typical profile of sexual partner preference in male ferrets. *Horm. Behav.* 30: 514-527. 1996.
- Kikusui T, Takigami S, Takeuchi Y, Mori Y. Alarm pheromone enhances stress-induced hypothermia in rats. *Physiol Behav.* 72:45-50. 2001.
- Killian J, Pratis K, Clifton RJ, Stanton PG, Robertson DM, O'Donnell. 5 $\alpha$ -reductase isoenzymes 1 and 2 in the rat testis during postnatal development. *Biol. Reprod.* 68:1711-1718. 2003.
- Kippin TE, Cain SW, Pfau JG. Estrous odors and sexually conditioned neutral odors activate separate neural pathways in the male rat. *Neuroscience*. 117:971-979. 2003.

Knutson B, Burgdorf J, Panksepp J. Ultrasonic vocalizations as indices of affective states in rats. *Psychol. Bull.* 128:961-977.2002.

Kolonie JM, Stern JM. Maternal aggression in rats: effects of olfactory bulbectomy, ZnSO<sub>4</sub>-induced anosmia, and vomeronasal organ removal. *Horm Behav.* 29:492-518. 1995.

Kondo Y. Lesions of the medial amygdala produce severe impairment of copulatory behavior in sexually inexperienced male rats. *Physiol. Behav.* 51:939-943.1992.

Kondo Y, Sachs BD. Disparate effects of small medial amygdala lesions on noncontact erection, copulation, and partner preference. *Physiol Behav.* 76:443-447. 2002.

Kondo Y, Sachs BD, Sakuma Y. Importance of the medial amygdala in rat penile erection evoked by remote stimuli from estrous females. *Behav. Brain Res.* 88:153-160. 1997. Corrected and republished: *ibid.* 91:215-221. 1998.

Kondo Y, Shinoda A, Yamanouchi K, Ari Y. Role of septum and preoptic area in regulating masculine and feminine sexual behavior in male rats. *Horm. Behav.* 24:421-434. 1990.

Kondo Y, Sudo T, Tomihara K, Sakuma Y. Activation of accessory olfactory bulb neurons during copulatory behavior after deprivation of vomeronasal inputs in male rats. *Brain Res.* 962:232-236. 2003

Kondo Y, Tomihara K, Sakuma Y. Sensory requirements of noncontact penis erection in the rat. *Behav. Neurosci.* 113:1062-1070. 1999.

Kovács KJ. c-Fos as a transcription factor: a stressful (rev)iew from a functional map. *Neurochem. Int.* 33:287-297. 1998.

Krey LC, McGinnis MY. Time-course of the appearance/disappearance of nuclear androgen + receptor complex in the brain and adenohypophysis following testosterone administration/withdrawal to castrated male rats: relationships with gonadotropin secretion. *J. Steroid. Biochem.* 35:403-408. 1990.

Kuiper GGJM, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinology.* 3:863-870. 1997.

Kumar A, Dudley CA, Moss RL. Functional dichotomy within the vomeronasal system: distinct zones of neuronal activity in the accessory olfactory bulb correlate with sex-specific behaviors. 1: *J Neurosci.* 19: RC32. 1999.

Larsson K. The Pattern of sexual behavior in the male rat. En : *Conditioning and sexual behavior in the male albino rat.* J. Elmgren (Ed). Almqvist & Wiksell, Stockhol. 1956. Pp. : 1-269.

Larsson K. Failure of gonadal and gonadotrophic hormones to compensate for an impaired sexual function in anosmic male rats. *Physiol. Behav.* 4:733-737. 1969.

Larsson K. Sexual impairment of inexperienced male rats following pre- and postpubertal olfactory bulbectomy. *Physiol. Behav.* 14:195-199. 1975.

Larsson K. Features of the neuroendocrine regulation of masculine sexual behavior. En : *Endocrine control of sexual behavior.* C. Beyer (Ed). Raven Press, New York. 1979. Pp.77-163.

Laurent G. A systems perspective on early olfactory coding. *Science.* 286. 723-728. 1999.

- Lehman MN, Winans SS. Vomeronasal and olfactory pathways to the amygdala controlling male hamster sexual behavior : Autoradiographic and behavioral analyses. *Brain. Res.* 240:27-41. 1982.
- Lehman MN, Winans SS, Powers JB. Medial nucleus of the amygdala mediates chemosensory control of male hamster sexual behavior. *Science.* 210:557-560. 1980.
- LeMagnen J. Les phenomenes olfacto-sexuels chez le rat blanc. *Arch. Sci. Physiol.* 6:295-322. 1952.
- Leon M, Johnson BA. Olfactory coding in the mammalian olfactory bulb. *Brain Res. Rev.* 42:23-32. 2003.
- Leypold BG, Yu CR, Leinders-Zufall T, Kim MM, Zufall F, Axel R. Altered sexual and social behaviors in *trp2* mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99:6376-6381. 2002.
- Lisk RD. Copulatory activity of the male rat following placement of preoptic-anterior hypothalamic lesions. *Exp. Brain. Res.* 5:306-313. 1968.
- Liu Y, Salamone JD, Sachs BD. Lesions in medial preoptic area and bed nucleus of stria terminalis: differential effects on copulatory behavior and noncontact erection in male rats. *J. Neuroscience.* 17:5245-5253. 1997.
- Lodder J, Baum MJ. Facilitation of mounting behavior by dihydrotestosterone propionate in castrated estradiol benzoate-treated male rats following pudendodectomy. *Behav. Biol.* 20:141-148. 1977.
- López HH, Olster DH, Ettenberg A. Sexual Motivation in the male rat: the role of primary incentives and copulatory experience. *Horm. Behav.* 36:176-187. 1999.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein determination with folin phenol reagent. *J. Biol Chem.* 193:265-267. 1951.
- Lu S, McKenna SE, Cologer-Clifford A, Nau EA, Simon NG. Androgen receptor in mouse brain: sex differences and similarities in autoregulation. *Endocrinology.* 139:1594-1601. 1998.
- Luo M, Fee MS, Katz LC. Encoding pheromonal signals in the accessory olfactory bulb of behavior mice. *Science.* 229:1196-1201. 2003.
- Lupo C, Dessi-Fulgheri F, Musi B, Larsson K. The effect of medial preoptic-anterior hypothalamic lesions on testosterone plasma levels and testosterone conversion in the hypothalamus of male rats. *Neurosc. Lett.* 39:261-265. 1983.
- MacLusky NJ, Philip A, Hurlburt C, Naftolin F. Estrogen formation in the developing rat brain: sex differences in aromatase activity during early post-natal life. *Psychoneuroendocrinology.* 10:355-361. 1985.
- Majkowski J. Kindling: a model of epilepsy and memory. *Act Neurol. Scandinav.* 74. Suppl. 109:97-108. 1986.
- Malsbury ChW. Facilitation of male rat copulatory behavior by electrical stimulation of the medial preoptic area. *Physiol. Behav.* 7: 797-805. 1971.
- Mennella JA, Moltz H. Infanticide in the male rat: the role of the vomeronasal organ. *Physiol Behav.* 42: 303-6. 1988.
- Matsumoto T, Honda S, Harada N. Alteration in sex-specific behaviors in male mice lacking the aromatase gene. *Neuroendocrinology.* 77:416-424. 2003.
- McEwen BS, Lieberburg I, Chaptal C, Krey LC. Aromatization: important for sexual differentiation of the

- neonatal rat brain. *Horm. Behav.* 9:249-263. 1977.
- McEwen BS, Pfaff DW, Zigmond RE. Factors influencing sex hormone uptake by rat brain regions. III. Effects of competing steroids on testosterone uptake. *Brain. Res.* 21:29-38. 1970.
- McGinnis MY, Dreifuss RM. Evidence for a role of testosterone –androgen receptor interactions in mediating masculine sexual behavior in male rats. *Endocrinology (Baltimore).* 124:618-626. 1989.
- McIntosh TK, Barfield RJ. The temporal pattern of 40-60 kHz ultrasonic vocalizations and copulation in the rat (*Rattus norvegicus*) *Behav. Neural. Biol.* 29 : 349-358. 1980.
- McIntyre BS, Barlow NJ, Sar M, Wallace DG, Foster PMD. Effects of in utero linuron exposure on rat wolffian duct development. 16:131-139. 2002.
- Meisel RL, Lumia AR, Sachs BD. Effects of olfactory bulb removal and flank shock on copulation in male rats. *Physiol Behav.* 25:383-387. 1980.
- Meisel RL, Lumia AR, Sachs BD. Disruption of copulatory behavior of male rats by olfactory bulbectomy at two, but not ten, days of age. *Exp. Neurol.* 77 :612-624. 1982.
- Mellon SH, Vaudry H. Biosynthesis of neurosteroids and regulation of their synthesis. In Biggio G and Pudri RH (Eds.). *Neurosteroids and Brain Function. International Review of Neurobiology.* San Diego, Academic Press. 46.Pp. 33-78. 2001.
- Menella JA, Moltz H. Infanticide in rats: male strategy and female counter-strategy. *Physiol. Behav.* 42:19-28.1988.
- Merari A, Ginton A. Characteristics of exaggerated sexual behavior induced by electrical stimulation of the medial preoptic area in male rats. *Brain. Res.* 86: 97-108. 1975.
- Meredith M, Marques DM, O'Connell RJ, Stern FL. Vomeronasal pump: significance for male hamster sexual behavior. *Science.* 207:1224-1226. 1980.
- Moralí G. Regulación hormonal de la conducta sexual masculina. En: *Biología de la Reproducción.* J. Velásquez-Moctezuma (Ed). México, UAM. 1998. Pp.: 399-417.
- Moralí G, Beyer C. Neuroendocrine control of mammals estrous behavior. En: *Endocrine control of sexual behavior.* C. Beyer (Ed). New York, Raven Press. 1979. Pp. : 33-71.
- Morgan JI, Curran T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: Involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Ann. Rev. Neurosci.* 14:421-451. 1991.
- Mossman CA, Dickamer LC. Odor preferences of female house mice (*Mus domesticus*) in seminatural enclosures. *J Comp. Psychol.* 110:131-138. 1996.
- Mueller D, Perdikaris D, Stewart J. Persistence and drug-induced reinstatement of a morphine-induced conditional place preference. 136:389-397. 2002.
- Mylehreest E, Wallace DG, Cattley RC, Foster PMD. Dose-dependent alterations in androgen-regulated male reproductive development in rats exposed to Di(n-butyl) Phthalate during late gestation. *Toxicological Sci.* 55:143-151. 2000.
- Negri-Cesi P, Colciago A, Motta L, Celotti ML. Aromatase expresión and activity in male and female cultures rat hypothalamic neurons: effect of androgens. *Mol. Cell. Endocrinol.* 178:1-10. 2001.

- Ninomiya K, Kimura T. Male odors that influence the preference of female mice: roles for urinary and preputial factors. *Physiol. Behav.* 44:791-795. 1988.
- Nishina H, Sato H, Suzuki T, Sato N, Iba H. Isolation and characterization of Fra-2, and additional member of the fos gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3619-3623. 1990.
- Nyby J, Kay E, Bean NJ, Dahinden Z, Kerchner M. Male mouse attraction to airborne urinary odors of conspecifics and food odors: effects of food deprivation. *J Comp. Physiol. Psychol.* 99:479-490. 1985.
- Oboh AM, Paredes RG, Baum MJ. A sex comparison in increments in Fos immunoreactivity in forebrain neurons of gonadectomized, testosterone-treated rats after mounting an estrous female. *Neurobiol. Learning and Memory.* 63:66-73. 1995.
- O'Connell RJ, Meredith M. Effects of volatile and nonvolatile chemical signals on male sex behaviors mediated by the main and accessory olfactory systems. *Behav. Neurosci.* 6:1083-1093. 1984.
- O'Donnell L, Pratis K, Staton PG, Robertson DM, McLachlan RI. Testosterone-dependent restoration of spermatogenesis in adult rat is impaired by 5  $\alpha$ -reductase inhibitor. *J. Androl.* 20:109-117. 1999.
- Olazábal DE, Kalinichev M, Morell JI. MPOA cytotoxic lesions and maternal behavior in the rat: effects of midpubertal lesions on maternal behavior and the role of ovarian hormones in maturation of MPOA control of maternal behavior. *Hormones Behav.* 41:126-138.2002.
- Olster DH. Ibotenic acid-induced lesions of the medial preoptic area/anterior hypothalamus enhanced the display of progesterone-facilitated lordosis in male rats. *Brain Res.* 626:99-105. 1993.
- Olster DH, Blaustein JD. Progesterone facilitation of lordosis in male and female Sprague-Dawley rats following priming with estradiol pulses. *Horm. Behav.* 22:294-304.1988.
- Ogawa S, Chester AE, Hewitt SC, Walker VR, Gustafsson JA, Smithies O, Korach KS, Pfaff DW. Abolition of male sexual behaviors in mice lacking estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  ( $\alpha\beta$ ERKO). *PNAS.* 97:14737-14741.2000.
- Paredes RG, Agmo A. Stereospecific actions of baclofen on sociosexual behavior, locomotor activity and motor execution. *Psychopharmacology.* 97:358-364.1989.
- Paredes RG, Alonso A. Sexual Behavior regulated (paced) by the female induces conditioned place preference. *Behav. Neurosci.* 111:123-128. 1997.
- Paredes RG, Baum MJ. Altered sexual partner preference in male ferrets given excitotoxic lesions of the preoptic area/anterior hypothalamus. *J. Neurosci.* 15:6619-6630. 1995.
- Paredes RG, Baum MJ. Role of the medial preoptic area/anterior hypothalamus in the control of masculine sexual behavior. In: Annual review of sex research, Vol 8. RC. Rosen, CM. Davis, III, Ruppel (Eds). Society scientific study of sexuality , Mason City. 1997. Pp. : 68-101.
- Paredes RG, Haller AE, Manero MC, Alvarado R, Agmo A. Medial preoptic area kindling induces sexual behavior in sexually inactive male rats. *Brain. Res.* 515, 20-26. 1990.
- Paredes RG, Highland L, Karam P. Socio-sexual behavior in male rats after lesions of the medial preoptic area: evidence for reduced sexual motivation. *Brain. Res.* 618:271-276. 1993.
- Paredes RG, Lopez ME, Baum MJ. Testosterone augments neuronal fos responses to estrous odors throughout the vomeronasal projection pathway of gonadectomized male and female rats. *Horm. Behav.* 33:48-57.1998.

- Paredes RG, Piña AL, Bermudez-Rattoni F. Hypothalamic but not cortical grafts induce recovery of sexual behavior and connectivity in medial preoptic area-lesioned rats. *Brain. Res.* 629: 351-355. 1993.
- Paredes RG, Piña AL, Fernandez-Ruiz J, Bermudez-Rattoni F. Fetal brain transplants induce recovery of male sexual behavior in medial preoptic area-lesioned rats. *Brain. Res.* 523:331-336. 1990.
- Paredes RG, Tzschenke T, Nakach N. Lesions of the medial preoptic area/anterior hypothalamus (MPOA/AH) modify partner preference in male rats. *Brain Res.* 81: 1-8. 1998.
- Paxinos. The rat nervous system. G. Paxinos (Ed). Academic Press, London. 1995. Pp.:899-921.
- Paxinos G, Watson CH. The rat brain in stereotaxic coordinates. G. Paxinos (Ed). Academic Press, New York. 1982. Pp. :1-400.
- Peirce JT, Nuttall RL. Duration of sexual contacts in the rat. *J Comp Physiol Psychol.* 54:585-587. 1961.
- Perkins A, Fitzgerald JA, Price EO. Luteinizing hormone and testosterone response of sexually active and inactive rams. *J. Anim Sci.* 70:2086-2093. 1992.
- Petrulis A, Peng M, Johnston RE. Effects of vomeronasal organ removal on individual odor discrimination, sex-odor preference, and scent marking by female hamster. *Physiol. Behav.* 66:73-83. 1999.
- Pfaff DW, Sakuma Y. Facilitation of the lordosis reflex of female rats from the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J. Physiol (London).* 288:189-202. 1979.
- Phoenix CH, Goy RW, Gerall AA, Young WC. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology.* 65:369-382. 1959.
- Pi X, Grattan DR. Expression of prolactin receptor mRNA is increased in the preoptic area of lactating rats. *Endocrine.* 11:91-8. 1999.
- Pollak EI, Sachs BD. Excitatory and inhibitory effects of stimulation applied during the postejaculatory interval of the male rat. *Behav. Biol.* 15:449-461. 1975.
- Pomerantz SM, Clemens LG. Ultrasonic vocalizations in male deer mice (*Peromyscus maniculatus bairdi*): Their role in male sexual behavior. *Physiol. Behav.* 27 : 869-872. 1981.
- Portillo W, Basañez E, Paredes RG. Permanent changes in sexual behavior induced by medial preoptic area kindling-like stimulation. *Brain. Res.* 96:10-14. 2003.
- Portillo W, Paredes RG. Control neuronal de la conducta sexual masculina. En: *Biología de la Reproducción.* J. Velázquez (Ed). Universidad Metropolitana. Unidad Iztapalapa. 1998. Pp. : 335-364.
- Portillo W, Paredes RG. Sexual and olfactory preference in noncopulating male rats. *Physiol. Behav.* 80:155-162. 2003.
- Portillo W, Paredes RG. Sexual incentive motivation, olfactory preference and activation of the vomeronasal projection pathway by sexually relevant cues in non-copulating and naive male rats. *Horm. Behav.* Aceptado.
- Poulin R, Simard J, Labrie C, Petitclerc L, Dumont M, Lagace L, Labrie F: Downregulation of estrogen receptor by androgens in the ZR-75-1 human breast cancer cell line. *Endocrinology.* 125:392-399. 1989.
- Powers B, Valenstein ES. Sexual receptivity: facilitation by medial preoptic lesions in female rats. *Science.* 175:1003-1005. 1972.

- Putnam SK, Sato S, Hull EM. Effects of testosterone metabolites on copulation and medial preoptic dopamine release in castrated male rats. *Horm Behav.* 44: 419-26. 2003.
- Putnam SK, Du J, Sato S, Hull EM. Testosterone restoration of copulatory behavior correlates with medial preoptic dopamine release in castrated male rats. *Horm Behav.* 39: 216-24. 2001.
- Racine RJ, Burnham WM, Gartner JG. Epileptiform activity and neural plasticity in limbic structures. *Brain Res.* 47:262-268. 1972.
- Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation: I After-discharge threshold. *Electroencepha. Clin. Neurophysiol.* 32:269-279. 1972.
- Rajendren G, Dudley CA, Moss RL. Role of the vomeronasal organ in the male-induced enhancement of sexual receptivity in female rats. *Neuroendocrinology.* 52: 368-72. 1990.
- Ray B, Mallick H, Kumar VM. Role of the medial preoptic area in termal preference of rats. *Indian J Physiol Pharmacol.* 45:445-450. 2001.
- Resko JA, Perkins A, Roselli CE, Fitzgerald JA, Choate JVA, Stormshak F. Endocrine correlates of partner preference behavior in rams. *Biol. Reprod.* 55:120-126. 1996.
- Retana-Marquez S, Bonilla-Jaime H, Velásquez-Moctezuma J. Lack of effect of corticosterone administration on male sexual behavior of rats. *Physiol. Behav.* 63:367-370. 1998.
- Retana-Marquez S, Bonilla-Jaime H, Vázquez-Palacios G, Martínez-García R, Velásquez-Moctezuma J. Changes in masculine sexual behavior, corticosterone and testosterone in response to acute and chronic stress in male rats. *Hor. Behav.* 44:327-337. 2003.
- Reznikov AG, Nosenko ND, Tarasenko LV, Sinitsyn PV, Polakova LI. Early and long-term neuroendocrine effects of prenatal stress in male and female rats. *Nuerosc. Behav. Physiol.* 31:1-5. 2001.
- Rhees RW, Al-Saleh HN, Kinghorn EW, Fleming DE, Lephart ED. Relationship between sexual behavior and sexually dimorphic structures in the anterior hypothalamus in control and prenatally stressed male rats. *Brain Res. Bull.* 50:193-199. 1999.
- Rhees RW, Kirk BA, Sephton S, Lephart ED. Effects of prenatal testosterone on sexual behavior, reproductive morphology and LH secretion in the female rat. *Dev Neurosci.* 19:430-7. 1997.
- Rissman EF, Wersinger SR, Taylor JA, Lubahn DB. Estrogen receptor function as revealed by knockout studies: neuroendocrine and behavioral aspects. *Horm Beba.* 31:232-243. 1997.
- Rissman EF, Wersinger SR, Fugger HN, Foster TC. Sex with knockout models: behavioral studies of estrogen receptor  $\alpha$ . *Brain Res Int.* 835:80-90. 1999.
- Romero PR, Beltramino CA, Career HF. Participation of the olfactory system in the control of approach behavior of the female rat to the male. *Physiol. Behav.* 47:685-690. 1990.
- Roos J, Roos M, Schaeffer C, Aron C. Sexual differences in the development of accessory olfactory bulbs in the rat. *J. Comp. Neurol.* 270:121-131. 1988.
- Rories C, Spelsberg TC. Ovarian steroid actino on gene expresión: mechanisms and models. *Annu. Rev. Physiol.* 51:653-681. 1989.

- Roselli CE, Cross E, Poonyagariyagon HK, Stadelman HL. Role of aromatization in anticipatory and consummatory aspects of sexual behavior in male rats. *Soc. Behav. Neuroendocrinol. Abs.* 5:346.2001.
- Roselli CE, Fasasi TA. Estradiol increases the duration of nuclear androgen receptors occupation in the preoptic area of the male rat treated with dihydrotestosterone. *J. Steroid Biochem Mol Biol.* 42:161-168. 1992.
- Roselli CE, Hortobn LE, Resko JA. Distribution and regulation of aromatase activity in the rat hypothalamus and limbic system. *Endocrinology.* 117:2471-2477. 1985.
- Roselli CE, Klosterman SA, Fasasi TA. Sex differences in androgen responsiveness in the rat brain: regional differences in the induction of aromatase activity. *Neuroendocrinology.* 64:139-145. 1996.
- Rosenblatt JS, Aronson LR. The decline of sexual behavior in male cats after castration with special reference to the role of prior sexual experience. *Behavior.* 12:285-338. 1958.
- Russo SJ, Jenab S, Fabian SJ, Festa ED, Kemen LM, Quiñónez-Jenab V. Sex differences in the conditioned rewarding effects of cocaine. *970:214-220.* 2003.
- Ryan BC, Vandenberg JG. Intrauterine position effects. *Neuros, Bibehav. Rev.* 26:665-678. 2002.
- Sachs BD, Bialy M. Female presence during the postejaculatory interval facilitates penile erection and 22 kHz vocalizations in male rats. *Behav. Neurosci.* 114:1203-1208. 2000.
- Sato Y, Wada H, Horita H, Suzuki N, Shibuya A, Adachi H, Kato R, Tsukamoto T, Kumamoto Y. 1995. Dopamine release in the medial preoptic area during male copulatory behavior in rats. *Brain Res.* 692:66-70.
- Saito TR, Moltz H. Copulatory behavior of sexually naive and sexually experienced male rats following removal of the vomeronasal organ. *Physiol. Behav.* 37:507-510. 1986.
- Sawrey DK, Dewsbury DA. Conspecific odor preferences in Muntane voles (*Microtus montanus*): effects of sexual experience. *Physiol. Behav.* 56:339-349. 1994.
- Scalia F, Winans SS. The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J. Comp. Neurol.* 161 :31-56. 1975.
- Scammell TE, Price KJ, Sagar SM. Hyperthermia induces c-fos expression in the preoptic area. *Brain. Res.* 618:303-307.1993.
- Schwartzkroin PA, Wyler AR. Mechanisms underlying epileptiform burst discharge. *Ann. Neurol.* 7:95-107.1980.
- Scordalakes EM, Imwalle DB, Rissman EF. Oestrogen's masculine side: mediation of mating in male mice. *Reproduction.* 124:331-8. 2002
- Segovia A, Guillamón A. Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway and sex differences in reproductive behaviors. *Brain. Res. Rev.* 18:51-74. 1993.
- Segovia A, Guillamón A. Searching for sex differences in the vomeronasal pathway. *Horm. Behav.* 30:618-626. 1996.
- Segovia S, Guillamón A. Effects of sex steroids on the development of the vomeronasal organ in the rat. *Brain Res.* 281:209-12. 1982.

- Selmanoff MK, Brodtkin LD, Weiner IR, Siiteri PK. Aromatization and 5-reduction of androgens in discrete hypothalamic and limbic regions of the male and female rat. *Endocrinology*. 101:841-848. 1977.
- Shin C, Rigsbee LC, McNamara JO. Anti-seizure and anti-epileptogenic effect of  $\gamma$ -vinyl  $\gamma$ -Aminobutyric acid in amygdaloid kindling. *Brain. Res.* 398:370-374. 1986.
- Shiosaka S, Sakanaka M, Inagaki S, Senba E, Hara Y, Takatsuki K, Takagi H, Kawai Y, Thohyama M. Putative neurotransmitters in the amygdaloid complex with special reference to peptidergic pathways. En : *Chemical Neuroanatomy*. PC. Emson (Ed.). Raven Press, New York. 1983. Pp. : 359-389.
- Shiple MT, Adamek GD. The connections of the mouse olfactory bulb : A study using orthograde and anterograde transport of wheatgerm agglutinin conjugated to horseradish peroxidase. *Brain. Res. Bull.* 12 :221-226. 1984.
- Sheng M, Greenberg ME. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*. 4:477-485. 1990.
- Shouse MN, Serman MB. Kindling a sleep disorder: degree of sleep pathology predicts kindled seizure susceptibility in cats. *Brain. Res.* 271:196-200.1983.
- Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I. Compartmental distribution of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  mRNA in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 388:507-525. 1997.
- Simerly RB, Gorski RA, Swanson LW. Neurotransmitter specificity of cells and fibers in the medial preoptic nucleus: An immunohistochemical study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 246: 343-363.1986.
- Simerly RB, Swanson LW. Projections of the medial preoptic nucleus: A *phaseolis vulgaris* leucoagglutinin anterograde tract-tracing study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 270: 209-242. 1988.
- Simerly RB, Young BJ. Regulation of estrogen receptor Messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus by sex steroid hormones. *Mol Endocrinol.* 5:424-432. 1991.
- Singer AG. A chemistry of mammalian pheromones. *J Steroids Biochem Mol Biol.* 4B:627-32. 1991.
- Slob AK, Bogers H, van Stolk MA. Effects of gonadectomy and exogenous gonadal steroids on sex differences in open-field behavior of adult rats. *Behav. Brain. Res.* 2:347-362.1981
- Slob AK, de Klerk LWL, Brand T. Homosexual and heterosexual partner preference in ovariectomized female rats: effects of testosterone, estradiol and mating experience. *Physiol. Behav.* 41:571-576.1987.
- Slob AK, van der Werff JJ, Bosch T. The fundamental role of gonadal steroids in sexual behavior. *Bailliere's Clin Psychiatry.* 3:1-24.1997.
- Smith MS, Freeman ME, Neill JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology.* 96:219-226.1975.
- Soulairac A, Soulairac ML. Effets de lésions hypothalamiques sur le comportement sexuel et le tractus du rat male. *Annals. Endocrinol (Paris).* 17:731-745.1956.
- Spelsberg TC, Rories C, Rejman JJ, Goldberger A, Fink K, Lau CK, Colvard DS, Wiseman G. Steroid action on gene expression: Possible roles of regulatory genes and nuclear acceptor sites. *Biol. Reprod.* 40:54-69. 1989.
- Stack EC, Balakrishnan R, Numan MJ, Numan M. A functional neuroanatomical investigation of the role of the medial preoptic area in neural circuits regulating maternal behavior. *Behav. Brain Res.* 131:17-36.2002.

- Stefanick ML, Davidson JM. Genital responses in noncopulators and rats with lesions in the medial preoptic area or midthoracic spinal cord. *Physiol. Behav.* 41: 439-444. 1987.
- Stern JJ. Responses of male rats to sex odors. *Physiol. Behav.* 5:519-524. 1970. *Brain Res.* 2001 Jun 8; 903(1-2): 242-6.
- Stock HS, Hand GA, Ford K, Wilson MA. Changes in defensive behaviors following olfactory bulbectomy in male and female rats. *Brain Res.* 903: 242-6. 2001.
- Stone J. Amygdala kindling effects on sleep and memory in rats. *Brain Res.* 449:135-140.1988.
- Stone CP, Barker RG, Tomilin MI. Sexual drive in potent and impotent male rats as measured by the Columbia obstruction apparatus. *J. Genet. Psychol.* 47:33-48. 1935.
- Stower L, Holy TE, Meister M, Dulac C, Koentges G. Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science.* 295:1493-1500. 2002.
- Swann JM. Gonadal steroids regulate behavioral responses to pheromones by actions on a subdivision of the medial preoptic nucleus. *Brain Res.* 750:189-194. 1997.
- Talmage-Riggs G, Ansel S. Homosexual behavior and dominance in a group of captive squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Folia primatologica.* 19:61-72.1973.
- Tanaka T, Lange H. L'effet d'embrasement (kindling effect) par stimulation amygdalienne chez le chat et le rat: Approche neurophysiologique et neuropharmacologique. *Rev. Electroencephalogr. Neurophysiol. Clin.* 5:41-44. 1975.
- Taylor JG, Keverne EB. Accessory olfactory learning. *Biol Cybern.* 64:301-5. 1991.
- Thorton JE. Heterotypical sexual behavior: implications from variations. En: *Olfaction and endocrine regulation* IRL Komisaruk, Ed. Siegel, Cheng y Feder. Press, London. Pp. 11-21. 1986.
- Tirindelli R, Mucignat-Caretta C, Ryba NJP. Molecular aspects of pheromonal communication via the vomeronasal organ of mammals. *Trends Neurosci.* 21:482-486. 1998.
- Tobet SA, Baum MJ, Tang HB, Shim JH, Canick JA. Aromatase activity in the perinatal rat forebrain: effects of age, sex and intrauterine position. *Dev. Brain Res.* 23:171-178. 1985.
- Tsukahara S, Yamanouchi K. Neurohistological and behavioral evidence for lordosis-inhibiting tract from lateral septum to periaqueductal gray in male rats. *J Comp Neurol.* 431: 293-310. 2001.
- Tsuru Y, Ishimura K, Fujita H, Osawa Y. Immunocytochemical localization of aromatase-containing neurons in the rat brain during pre-and postnatal development. *Cell. Tiss. Res.* 278:29-39. 1994.
- Veney SL, Rissman EF, Freeman LM. Perinatal organization of a sexually dimorphic aromatase enzyme-containing immunoreactive nucleus. *Neuroreport.* 11:3409-12. 2000.
- Vega Matuszczyk J, Appa RS, Larson K. Age-dependent variations in the sexual preference of male rats. *Physiol. Behav.* 55 :827-830.1994.
- Vega Matuszczyk J, Larsson K. Experience modulates the influence of gonadal hormones on partner preference. *Physiol. Behav.* 55:527-531.1994.

- Veyssiere G, Berger M, Jean -Faucher C, Turckheim M, Jean C. Testosterone and dihydrotestosterone in sexual ducts and genital tubercle of rabbit fetuses during sexual organogenesis: effects of fetal decapitation. *J. Steroid Biochem.* 17:149-154. 1982.
- Vreeburg JTM, van der Vaart PDM, van der Schoot P. Prevention of central defeminization but not masculinization in male rats by inhibition neonatal of oestrogen biosynthesis. *J. Endocrin.* 74:375-382. 1977.
- Vreeburg JTM, Groeneveld JO, Post PE, Ooms MP. Concentrations of testosterone and androsterone in peripheral and umbilical venous plasma of fetal rats. *J. Reprod. Fert.* 68:171-175.1983.
- Wada JA, Sato M, Corcoran ME. Persistent seizures susceptibility and recurrent spontaneous seizures susceptibility and recurrent spontaneous seizures in kindling cats. *Epilepsia.* 15:465-478.
- Wallen K, Schneider JE. *Reproduction in context: social and environmental influences on reproduction.* MIT Press, Cambridge, MA. 2000.
- Wang CT, Huang RL, Tai MY, Tsai YF, Peng MT. Dopamine release in the núcleo accumbens during sexual behavior in prenatally stressed adult male rats. 1995, 200:29-32.
- Ward IL. The prenatal stress syndrome: current status. *Psychoneuroendocrinol.* 9:3-11.1984.
- Ward IL, Weisz J. Differential effects of maternal stress on circulating levels of corticosterone, progesterone, and testosterone in fetal males. *Science* 207:328-329. 1984.
- Watanobe H. In vivo release of prolactin-releasing peptide in rat hypothalamus in association with luteinizing hormone and prolactin surges. *Neuroendocrinology.* 74:359-366.2001.
- Weisz J, Ward IL. Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetus and neonatal offspring. *Endocrinology.* 106: 81-87. 1980.
- Wersinger SR, Rissman EF. Dopamine activates masculine sexual behavior independent of the estrogen receptor alpha. *J. Neurosci.* 20:4248-4254. 2000.
- Wersinger SR, Sannen K, Villalba C, Lubahn DB, Rissman EF, De Vriest GJ. Masculine sexual behavior is disrupted in male and female mice lacking a functional estrogen receptor  $\alpha$  gene. *Hor Beba.* 32:176-183. 1997.
- Wenzel BM. The olfactory system and behavior. En : *Limbic and autonomic nervous systems research.* I.V. Di Cara (Ed). Plenum Pres, New York. 1974. Pp. : 230-257.
- Whalen RE, Beach FA, Kuehn RE. Effects of exogenous androgen on sexually responsive and unresponsive male rats. *Endocrinology.* 69:373-380.1961.
- Whalen RE, Edwards DA. Hormonal determinants of the development of masculine and feminine behavior in male and female rats. *Anat. Rec.* 157:173-180.1967.
- Whishaw IQ, Li K, Whishaw A, Gorny B, Metz GA. Distinct forelimb and hind limb stepping impairment in unilateral dopamine-depleted rats: use of the rotorod as a method for the qualitative analysis of skilled walking. *J. Neurosci. Meth.* 126:13-23. 2003.
- White NR, Cagiano R, Moisés AU, Barfield RJ. Changes in mating vocalizations over the ejaculatory series in rats (*Rattus norvegicus*). *J. Comp. Psicol.* 104:255-262.1990.
- Whitney G, Coble JR, Stockton MD, Tilson EF. Ultrasonic emissions: Do they facilitate courtship in mice ? *J. Comp. Physiol. Psychol.* 84 :445-452. 1973.

- Wilbert DM, Griffin JE, Wilson JD. Characterization of the cytosol androgen receptor of the human prostate. *J Clin Endocrinol Metab.* Jan; 56: 113-20. 1983.
- Wilke DL, Tseu SR, Rhees RW, Fleming DE. Effects of environmental stress or ACTH treatment during pregnancy on maternal and fetal plasma androstenedione in the rat. *Horm. Behav.* 16:293-303.1982.
- Winans SS, Powers JB. Olfactory and vomeronasal differentiation of male hamsters: histological and behavioral analyses. *Brain. Res.* 126:325-344. 1977.
- Wintink AJ, Young NA, Davis AC, Gregus A, Kalynchuk LE. Kindling-induced emotional behavior in male and female rats. *Behav Neurosci.* 117:632-40. 2003.
- Wood RI. Thinking about networks in the control of male hamster sexual behavior. *Horm. Behav.* 32:40-45. 1997.
- Wood RI, Newman SW. Intracellular partition of androgen receptor immunoreactivity in the brain of the male syrian hamster: effects of castration and steroid replacement. *J. Neurobiol.* 24:925-938. 1993.
- Yamanouchi K, Arai Y. Female lordosis pattern in the male rat induced by estrogen and progesterone: Effect of interruption of the dorsal inputs to the preoptic area and hypothalamus. *Endocrine. J.* 43:243-246. 1975.
- Yamanouchi K, Arai Y. The role of mesencephalic tegmentum in regulating female rat sexual behavior. *Physiol. Behav.* 35:255-259. 1985.
- Young CYF, Jonson MP, Prescott JL, Tindall DJ. The androgen receptor of the testicular -feminized (Tfm) mutant mouse is smaller than the wild-type receptor. *Endocrinology.* 124:771-775. 1989.
- Zamenhof S, VanMarthens E. Effect of intrauterine position on fetal brain development in the rat. *Develop. Brain Res.* 28, 267-270. 1989.
- Zerial M, Toschi L, Ryseck R, Schuermann M, Muller R, Bravo R. The product of a novel growth activated gene, fos B, interacts with jun proteins enhancing their DNA binding affinity. *EMBO Journal.* 8:805-813. 1989.
- Zhong GX, Da Su J, Sun QW, Jiao BH. Expression of estrogen receptor (ER)  $\alpha$  and  $\beta$  transcripts in the neonatal and adult rat cerebral cortex, cerebellum, and olfactory bulb. *Cell Res.* 11:321-324. 2001.
- Zuckerman S. The social behavior of monkeys and apes. Harcourt, Brace, New York. 1932.