

DEPARTAMENTS DE BIOLOGIA CEL·LULAR I
PARASITOLOGIA

NEUROQUÍMICA DEL REFUERZO INDUCIDO POR
FEROMONAS

M^a CARMEN AGUSTÍN PAVÓN

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 17 de juny de 2008 davant un tribunal format per:

- D. Jesús Pérez Clausell
- D. Alino Martínez Marcos
- D. Fernando Rodríguez Fernández
- D. Juan José Canales Conejero
- D. Luis Granero Maciá

Va ser dirigida per:

D. Enrique Lanuza Navarro

D. Fernando Martínez-García

©Copyright: Servei de Publicacions
M^a Carmen Agustín Pavón

Depòsit legal:

I.S.B.N.: 978-84-370-7230-2

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

2008



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA



Facultat de Ciències Biològiques
Departament de Biologia Cel·lular i Parasitologia
Departament de Biologia Funcional i Antropologia Física

Neuroquímica del refuerzo inducido por feromonas

M^a Carmen Agustín Pavón

TESIS DOCTORAL

TESIS DOCTORAL
M^a Carmen Agustín Pavón
2008



NEUROQUÍMICA DEL REFUERZO INDUCIDO POR FEROMONAS

Tesis doctoral

M^a Carmen Agustín Pavón

2008



VNIVERSITAT ID VALÈNCIA

Facultat de Ciències Biològiques

Departament de Biologia Cel·lular i Parasitologia

Departament de Biologia Funcional
i Antropologia Física

D. Enrique Lanuza Navarro y D. Fernando Martínez García, doctores en Biología y Profesores Titulares de los Departamentos de Biología Celular y Parasitología y de Biología Funcional y Antropología Física de la Universidad de Valencia

CERTIFICAN

que Dña. **M^a Carmen de Agustín Pavón**, licenciada en Biología por la Universitat de València, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado ***“Neuroquímica del refuerzo inducido por feromonas”*** para la obtención del grado de Doctor en Biología.

Para que conste, en cumplimiento de la legislación, firmamos el presente certificado en:

Valencia a 15 de Abril de 2008

Dr. Enrique Lanuza Navarro

Dr. Fernando Martínez García

Para la realización de esta tesis, la autora ha sido beneficiaria de una beca del Programa de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación y Ciencia (convocatoria del 11 de Julio de 2003) según la resolución del 30 de diciembre de 2003 de la Secretaría de Estado de Educación y Universidades.

Este trabajo se ha enmarcado dentro de los proyectos “Base neural del valor reforzante de feromonas sexuales y olores asociados en ratones: un modelo innovador para el estudio neurobiológico del aprendizaje emocional.” BFI2001-3535, 2002-2004, y “Neurobiología de la atracción sexual. Bases neurales del refuerzo inducido por feromonas sexuales.” BFU2004-04272, 2005-2007. Financiados por el Ministerio de Ciencia y Tecnología.

A José Vicente

Disculpen la cursilería.

Creo que el comportamiento bondadoso y desinteresado lo relató Cortázar de manera magistral cuando nos explicó que *ahora pasa que las tortugas son grandes admiradoras de la velocidad, como es natural. Las esperanzas lo saben, y no se preocupan. Los famas lo saben, y se burlan. Los cronopios lo saben, y cada vez que encuentran una tortuga, sacan la caja de tizas de colores y sobre la redonda pizarra de la tortuga dibujan una golondrina*. Me siento enormemente afortunada por haber encontrado en mi camino tantas personas con cualidades de *cronopio* que han hecho posible mi supervivencia a estos años y que esta tesis doctoral que ha costado tantas horas y tantas drogas haya podido por fin ver la luz.

En primer lloc, he d'agrair, com es natural, als meus incomparables directors, el Dr. Lanuza i el Dr. Martínez García, que m'acolliren, m'ensenyaren, em recolzaren, m'espentaren i, sobre tot, han mostrat una paciència infinita amb mi. Gràcies per haver-me regalat l'oportunitat de començar una carrera investigadora, i gràcies per haver segut sempre Quique i Fernando.

Els meus companys de fatigues ja haurien de saber el que han representat per a mi després de litres de cafè de màquina com per a foradar uns quants estómacs. Però per si encara així no els ha quedat clar, deixeu constància de que no podia haver somniat treballar amb millors persones, i que un dels millors regals de la tesi ha segut poder treballar colze amb colze amb ells i malgrat això haver arribat a ser grans amics.

A mi familia no quiero agradecerle las cosas obvias. Sólo quiero que sepan que esta tesis no habría sido de no haberme dejado la mejor de las herencias: la curiosidad. Que me siento muy orgullosa de que mi tesis sea hija y nieta y sobrina de personas admirables, que aun a falta de colegio nunca dejaron de poseer unas envidiables ganas de aprender.

Aprender tanto es tan inevitable durante el desarrollo de una tesis... incluso que no podemos asumir la ortogonalidad de nuestros caminos, y que esto es mejor aprenderlo con la ayuda de *eine grosse Weissbier* o un cortado descafeinado de sobre.

A José Vicente debería agradecerse todo. Pero no puedo aquí, primero porque no me cabe y segundo porque él no es amigo de estas ñoñeces. En todo caso, se merece un monumento por llevar a mi lado más de una década y seguir queriéndome a pesar de todo. Valga de semi-monumento la dedicatoria de esta tesis. Porque si a lo largo de estos años me he levantado todas las mañanas, muchas de ellas lo he conseguido sólo porque alguien debía preparar el desayuno para los dos.

Keep yourself alive.

Queen, del álbum homónimo.

The best laid schemes o' mice an' men

gang aft agley

Robert Burns, To a mouse.

Nada más económico ni más cautivador
para un espíritu medianamente filosófico

que el estudio de los instintos;

del modo de reacción de los animales

en presencia de los excitantes;

de las leyes del hábito y la memoria.

Santiago Ramón y Cajal,

Reglas y consejos sobre investigación científica.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	13
ÍNDICE DE TABLAS	16
PRESENTACIÓN	18
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	21
1.1 ¿Qué es el refuerzo?.....	21
1.1.1 La circuitería neural clásica del refuerzo.....	25
1.1.2 La crisis de la hipótesis dopaminérgica de la anhedonia.....	27
1.2 Las feromonas sexuales como estímulo reforzante natural.....	33
1.2.1 ¿Qué son las feromonas?.....	33
1.2.2 ¿Son reforzantes las feromonas sexuales?	35
1.2.3 Anatomía del sistema de detección de las feromonas.....	36
1.3 Amígdala y refuerzo.....	40
2. OBJETIVOS.....	46
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	48
3.1 Animales.....	48
3.2 Fármacos.....	50
3.2.1 Elección de las dosis	50
3.3 Cirugía.....	53
3.3.1 Valoración de las lesiones	54
3.4 Protocolos comportamentales	55
3.4.1 Experimentos de atracción innata por feromonas de macho.....	55

3.4.2 Experimentos de condicionamiento de preferencia de lugar utilizando feromonas de macho como estímulo reforzante.....	59
3.4.3 Experimentos de discriminación olfativa.....	61
3.4.4 Experimentos de preferencia por una solución azucarada frente a agua.....	63
3.5 Medidas comportamentales.....	65
3.6 Análisis estadístico.....	68
4. ESTUDIOS DESARROLLADOS.....	69
4.1 Papel de los sistemas catecolaminérgicos en el refuerzo inducido por feromonas de macho.....	69
4.1.1 Justificación.....	69
Sistemas dopaminérgicos.....	70
Dopamina y refuerzo.....	72
Sistemas noradrenérgicos.....	77
Noradrenalina, refuerzo y sexo.....	78
4.1.2 Grupos experimentales.....	79
4.1.3 Resultados.....	82
Experimento 1.A: Efecto de fármacos dopaminérgicos sobre la atracción innata por feromonas de macho.....	82
Experimento 1.B: Efecto de la anfetamina sobre la función olfativa de las hembras de ratón.....	91
Experimento 1.C: Efecto de los antagonistas de la dopamina sobre la adquisición de preferencia de lugar condicionada por feromonas de macho.....	93
Experimento 1.D: Efecto de fármacos con actividad noradrenérgica sobre la atracción innata por feromonas de macho.....	96
4.1.4 Discusión.....	102
Efectos sensoriales y motores de las drogas utilizadas.....	102
Contribución de las distintas catecolaminas a la atracción innata por feromonas de macho.....	104
La apetencia por feromonas como parte del comportamiento sexual.....	106
Un nuevo modelo para el estudio de las propiedades hedónicas independientes de dopamina de una recompensa.....	108

10 Neuroquímica del refuerzo inducido por feromonas

Vías neurales del procesado del refuerzo: efecto modulador de la dopamina a través de los receptores D1	110
Falta de efecto de los antagonistas dopaminérgicos en la adquisición de preferencia de lugar condicionada por feromonas de macho	111
4.2 Papel de los sistemas opioidérgicos en el refuerzo inducido por feromonas de macho	113
4.2.1 Justificación	113
4.2.2 Grupos experimentales.....	116
4.2.3 Resultados	119
Experimento 2.A: Efecto de fármacos opioidérgicos sobre el consumo preferente de una solución de sacarosa.....	119
Experimento 2.B: Efecto de los fármacos opioidérgicos sobre la atracción innata por feromonas de macho	120
Experimento 2.C: Efecto de la naloxona sobre la adquisición de preferencia de lugar condicionada por feromonas de macho	123
4.2.4 Discusión	126
Efecto de los opioides sobre el procesado de la información vomeronasal: inhibición opioidérgica de los comportamientos socio-sexuales	126
Efecto diferencial de los opiáceos en los comportamientos pre-copulatorios y la cópula	129
Opiáceos, feromonas sexuales y sabor dulce: los diferentes tipos de recompensas quimiosensoriales son procesados por circuitos neurales distintos	130
4.3 Papel del óxido nítrico y la serotonina en la atracción innata por feromonas de macho	134
4.3.1 Justificación	134
Sistema serotoninérgico	135
Óxido nítrico.....	137
4.3.2 Grupos experimentales.....	141
4.3.3 Resultados	143
Experimento 3.A: Efecto de fármacos serotoninérgicos sobre la atracción innata por feromonas de macho	143
Experimento 3.B: Efecto del L-NAME sobre la atracción innata por feromonas de macho	149

Experimento 3.C: Efecto del L-NAME sobre la discriminación olfativa de orina de macho	150
4.3.4 Discusión	152
Efectos de los fármacos serotoninérgicos a lo largo de la vía vomeronasal	152
Efecto del antagonista de NO a lo largo de la vía vomeronasal	154
El NO en la red neural que controla los comportamientos socio-sexuales	157
4.4 Los islotes de Calleja y la atracción innata por feromonas de macho	164
4.4.1 Justificación	164
4.4.2 Grupos experimentales.....	169
4.4.3 Resultados.....	171
Experimento 4: Lesión de la zona de proyección de la amígdala vomeronasal en el estriado ventral.....	171
4.4.4 Discusión	176
Hiperlocomoción en los animales lesionados.....	176
La previamente discutida pero nunca demostrada función de los islotes de Calleja ...	177
Los islotes de Calleja y el comportamiento socio-sexual	179
Implicaciones de la inclusión de los islotes de Calleja en las vías del refuerzo de estímulos quimiosensoriales	182
5. DISCUSIÓN GENERAL.....	187
5.1 Sobre la metodología	189
5.1.1 El test de preferencia por feromonas de macho y el refuerzo	189
5.1.2 Efecto techo en el protocolo de preferencia por feromonas de macho.....	190
5.1.3 Interpretación de los resultados derivados de la administración sistémica de los fármacos	192
5.2 El significado funcional del comportamiento de escarbar.....	195
5.3 Sobre la posible naturaleza de las feromonas innatamente atractivas	201
5.4 La neuroquímica del refuerzo inducido por feromonas.....	207

12 Neuroquímica del refuerzo inducido por feromonas

5.5 ¿Existe un “centro del placer” en la circuitería neural del refuerzo?	219
5.6 Una perspectiva evolutiva.....	223
5.6.1 El olfatoestriado de mamíferos.....	223
5.6.2 ¿Qué es la amígdala?.....	225
6. CONCLUSIONES	229
BIBLIOGRAFÍA	232

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de un ejemplo de aprendizaje inducido por refuerzo.....	24
Figura 2. Esquema de la vía dopaminérgica tegmento-estriatal como responsable clásica del refuerzo.	27
Figura 3. Esquema simplificado de la anatomía del sistema vomeronasal en el encéfalo del ratón.	37
Figura 4. Esquema de las principales aferencias y eferencias de la amígdala de mamíferos.	42
Figura 5. ¿Es la amígdala un sistema funcional?	44
Figura 6. Diagramas de frecuencia de las dosis de drogas dopaminérgicas (aplicadas sistémicamente) utilizadas en estudios comportamentales en rata o ratón.....	52
Figura 7. Caja de metacrilato empleada en los experimentos de atracción innata y preferencia de lugar condicionada por feromonas sexuales de macho.....	56
Figura 8. Caja utilizada para los experimentos de habituación-deshabituación.	62
Figura 9. Capturas de la pantalla mostrada por el programa SMART 2.5, con dos recorridos típicos efectuados por los animales.....	66
Figura 10. Ruta de síntesis de las catecolaminas.....	70
Figura 11. Esquema de los principales sistemas dopaminérgicos en el encéfalo del ratón.	71
Figura 12. Hipótesis de la predicción de errores de Schultz.....	75
Figura 13. Esquema de los principales sistemas noradrenérgicos en el encéfalo del ratón.	77
Figura 14. Efecto de los antagonistas dopaminérgicos sobre la atracción innata por feromonas de macho y el comportamiento de escarbar.	84
Figura 15. Efecto de la anfetamina sobre la atracción innata por feromonas de macho y el comportamiento de escarbar.....	87

14 Neuroquímica del refuerzo inducido por feromonas

Figura 16. Efecto de los agonistas específicos de la dopamina sobre la atracción innata por feromonas de macho y el comportamiento de escarbar.....	91
Figura 17. Efecto de la anfetamina en el test de habituación-deshabitación utilizando olores neutros.....	93
Figura 18. Tiempo en la zona delimitada alrededor de la viruta de macho durante la primera sesión de entrenamiento en el experimento de preferencia condicionada de lugar bajo tratamiento con los antagonistas dopaminérgicos.	94
Figura 19. Efecto del tratamiento con antagonistas dopaminérgicos sobre la adquisición de preferencia de lugar condicionada por feromonas de macho....	95
Figura 20. Efecto de la desipramina sobre la atracción innata por feromonas de macho y el comportamiento de escarbar.....	98
Figura 21. Efecto de la yohimbina en la atracción innata por feromonas de macho y el comportamiento de escarbar.....	100
Figura 22. Niveles de expresión del receptor μ -opiáceo en un esquema de la conectividad algunos núcleos de interés.....	116
Figura 23. Efecto de las drogas opioidérgicas sobre el consumo preferente de una solución de sacarosa 5% frente a agua.	119
Figura 24. Efecto de un antagonista opiáceo sobre la atracción innata por feromonas de macho.	121
Figura 25. Efecto de un agonista de los receptores μ sobre la atracción innata por feromonas de macho.	123
Figura 26. Tiempo en las zonas delimitadas alrededor de la viruta de macho durante la primera sesión de entrenamiento en el experimento de preferencia condicionada de lugar.	124
Figura 27. Efecto del antagonista opioidérgico en la adquisición de preferencia de lugar condicionada por feromonas sexuales de macho.....	124
Figura 28. Esquema de los principales sistemas serotoninérgicos en el encéfalo del ratón.	135

Figura 29. Detección histoquímica de la actividad NADPH diaforasa en diversos núcleos de la vía vomeronasal en el ratón.	139
Figura 30. Efecto del ketanserin sobre la atracción innata por feromonas de macho.	145
Figura 31. Efecto del DOI sobre la atracción innata por feromonas de macho y sobre el comportamiento de escarbar.	148
Figura 32. Efecto de un inhibidor de la NOS sobre la atracción innata por feromonas sexuales de macho.	150
Figura 33. Efecto del antagonista de la NOS sobre la capacidad olfativa de detectar la orina de macho.	151
Figura 34. La red de los comportamientos socio-sexuales.	158
Figura 35. Citoarquitectura de los islotes de Calleja.....	166
Figura 36. Cortes histológicos, teñidos con azul de toluidina, representativos de los cerebros de los animales utilizados para el experimento explorando el efecto de una lesión de la zona de proyección de la amígdala vomeronasal en el estriado ventral sobre la atracción innata por feromonas de macho.....	172
Figura 37. Dibujos de los cortes histológicos mostrados en la Figura 36 con un esquema de la citoarquitectura principal y la representación de la zona lesionada.....	173
Figura 38. Efecto de una lesión de los islotes de Calleja magnos (y parte del estriado circundante) en la atracción innata por feromonas de macho.	175
Figura 39. Ampliación de la red neural de los comportamientos socio-sexuales.	182
Figura 40. Comportamiento de escarbar en las hembras control tratadas con salino.....	197
Figura 41. Esquema del circuito más probable de control de los comportamientos y reacciones endocrinas mediadas por feromonas sexuales, y los sitios de acción más probables de las drogas utilizadas.....	214
Figura 42. La amígdala como sistema funcional.....	227

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fármacos utilizados en los estudios desarrollados.	51
Tabla 2. Recopilación de las drogas, dosis y número de animales empleados en los experimentos farmacológicos para explorar la neuroquímica de la atracción innata por feromonas sexuales.	58
Tabla 3. Número de animales empleados para explorar el efecto de la lesión de la zona de proyección de la amígdala vomeronasal sobre el estriado ventral (zona circundante del islote de Calleja magno) sobre la atracción innata por feromonas de macho.	59
Tabla 4. Recopilación de las drogas, dosis y número de animales empleados en los experimentos farmacológicos para explorar la neuroquímica de la adquisición de preferencia de lugar condicionada por feromonas de macho....	61
Tabla 5. Recopilación de los fármacos, dosis y número de animales utilizados en los experimentos para descartar un efecto sensorial de las drogas.....	63
Tabla 6. Recopilación de los fármacos, dosis y número de animales utilizados en los experimentos farmacológicos de preferencia por una solución azucarada. .	64
Tabla 7. Grupos experimentales utilizados para explorar el efecto de las drogas dopaminérgicas sobre la atracción innata de las hembras de ratón por feromonas de macho.	80
Tabla 8. Grupos experimentales utilizados para explorar el efecto de la amfetamina sobre la capacidad de los sujetos experimentales de detectar olores neutros.....	80
Tabla 9. Grupos experimentales utilizados para explorar el efecto del bloqueo farmacológico de los receptores D1 y D2 durante la adquisición de una preferencia de lugar condicionada por feromonas de macho.	80
Tabla 10. Grupos experimentales utilizados para explorar el efecto de fármacos con actividad noradrenérgica sobre la atracción innata de las hembras de ratón por feromonas de macho.	81

Tabla 11. Parámetros comportamentales medidos en los grupos tratados con las dosis baja de SKF y alta de Quin.	89
Tabla 12. Grupos experimentales utilizados para explorar el efecto de las drogas opioidérgicas sobre el consumo preferente de una solución azucarada frente a agua.	117
Tabla 13. Grupos experimentales utilizados para explorar el efecto de las drogas opioidérgicas sobre la atracción innata por feromonas de macho.	118
Tabla 14. Grupos experimentales utilizados para explorar el efecto del antagonista opiáceo en la adquisición de preferencia de lugar condicionada por feromonas de macho.....	118
Tabla 15. Grupos experimentales utilizados para comprobar la implicación de la serotonina en la atracción innata por feromonas de macho en hembras de ratón.....	141
Tabla 16. Grupos experimentales para estudiar la implicación del NO en la atracción innata por feromonas de macho.....	142
Tabla 17. Grupos experimentales para investigar el efecto del inhibidor de la NOS sobre la discriminación sensorial de la orina de macho.....	142
Tabla 18. Medidas adicionales de movilidad de los animales en el experimento explorando los efectos del ketanserin sobre la atracción innata por feromonas.	144
Tabla 19. Grupos experimentales y número de animales empleados para investigar los efectos de una lesión de la zona de proyección en el estriado ventral de la amígdala vomeronasal sobre la atracción innata por feromonas de macho.	170
Tabla 20. Resumen de los efectos comportamentales medidos para cada fármaco y dosis en el total de los experimentos farmacológicos.....	209

PRESENTACIÓN

Esta memoria recoge el trabajo realizado en los departamentos de Biología Celular y Parasitología y Biología Funcional y Antropología Física de la Facultad de Ciencias Biológicas bajo la dirección del Dr. Enrique Lanuza Navarro y el Dr. Fernando Martínez García entre los años 2004 y 2007.

En este trabajo se estudia la neuroquímica del refuerzo inducido por feromonas sexuales masculinas en el ratón hembra (*Mus musculus*). El manuscrito se estructura como sigue:

En la primera sección, se ofrece una **Introducción General** en la cual expondremos cómo el estudio de los mecanismos subyacentes al refuerzo inducido por feromonas sexuales masculinas proporciona un modelo útil y novedoso para el estudio de los mecanismos del refuerzo en general, así como de la función de la amígdala en dichos procesos.

A continuación, se señalan los **Objetivos** a alcanzar mediante los Estudios Desarrollados en la presente tesis doctoral.

El primer capítulo de la sección de **Estudios Desarrollados** se dedica al estudio del efecto de drogas dopaminérgicas sobre la atracción innata y el condicionamiento de preferencia de lugar por feromonas sexuales de macho, así como de fármacos con actividad noradrenérgica sobre la atracción innata.

El segundo capítulo de dicha sección se centra en el estudio del posible papel de los opiáceos en el refuerzo de feromonas, comparándolo con su conocida implicación en el refuerzo inducido por otra recompensa natural, como es el sabor dulce.

Por último, el tercer y cuarto capítulos de los **Estudios Desarrollados** se ocupan del estudio de la importancia de las conexiones amígdalo-estriatales para el refuerzo inducido por feromonas, específicamente de las proyecciones de la amígdala vomeronasal sobre el estriado ventral. En el tercer capítulo se utilizará la misma aproximación farmacológica-comportamental que en los capítulos precedentes, mientras que en el cuarto se realizarán lesiones electrolíticas de las zonas de interés para comprobar su efecto sobre la atracción innata por feromonas de macho.

A continuación, en la **Discusión General** se discutirán de manera conjunta los resultados obtenidos a lo largo de la realización de la tesis, intentando esclarecer las vías neurales y los neurotransmisores que participan en el control del refuerzo inducido por feromonas de macho en las hembras del ratón.

Para finalizar, se apuntan las **Conclusiones** fundamentales derivadas del presente trabajo, y por último se ofrece la **Bibliografía** completa utilizada para la preparación de los experimentos y la discusión de los resultados.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 ¿QUÉ ES EL REFUERZO?

La posesión de un sistema nervioso permite a los vertebrados elaborar respuestas en función de los estímulos externos, dirigiendo su comportamiento hacia la consecución de fines provechosos o necesarios, como la obtención de comida o de un compañero sexual, y la evitación de eventos peligrosos o deletéreos, como el encuentro con un predador. Para ello, los vertebrados contamos con un repertorio comportamental innato dotado de una gran plasticidad, lo que nos permite modificar las respuestas del mismo, así como adquirir nuevas, por medio del aprendizaje.

Por ejemplo, una rata macho virgen a la que se presenten dos hembras, una en estro y la otra no receptiva, intentará montar a ambas (Figura 1A). Eventualmente, será rechazado violentamente por la hembra no receptiva y obtendrá una respuesta de lordosis de la receptiva, lo que desembocará en la consecución de la cópula (Figura 1B). Tras varios encuentros de este tipo, el joven macho aprenderá a distinguir el olor característico de las hembras en estro, y en lo sucesivo sólo intentará la monta con éstas (Figura 1C). Según la *ley del efecto* de Thorndike (1911), cuando un animal expresa un comportamiento y obtiene un estímulo *placentero*, se produce un *refuerzo* de la asociación estímulo-respuesta. Por el contrario, si el comportamiento conlleva la obtención de un estímulo *aversivo*, la expresión de este comportamiento disminuye y acaba por desaparecer. Por tanto, podríamos decir que la cópula con la rata hembra en estro constituye una *recompensa* para el macho. Así, se produce una asociación entre un estímulo inicialmente neutro (el olor de la hembra en estro) con un estímulo incondicionado (la cópula con la hembra) que refuerza la respuesta condicionada de aproximación hacia las hembras en estro para consumir la cópula.

En el ámbito del laboratorio se utilizan diversas aproximaciones para estudiar el refuerzo. Así, una manera sencilla de comprobar las propiedades reforzantes de un estímulo es el paradigma de la *preferencia condicionada por un lugar* (Tzschentke, 1998). Para este tipo de condicionamiento se suelen utilizar cajas con dos compartimentos, uno de los cuales se asociará con la recompensa; por ejemplo, la presencia de una hembra receptiva para un macho de rata. De esta manera, la asociación de la cópula con el lugar en el que sucede tendrá como

resultado que, a la larga, el animal prefiera el compartimento reforzado, aún cuando la hembra no esté presente. Es decir, el macho habrá adquirido una *preferencia condicionada* por el compartimento donde recibe la recompensa. El condicionamiento de preferencia de lugar se considera fundamentalmente de tipo pavloviano, es decir, el animal aprende una asociación entre un estímulo inicialmente neutro (el compartimento) y un estímulo incondicionado reforzante (la cópula).

Por el contrario, si el animal debe aprender a emitir una respuesta activa para conseguir su recompensa, el condicionamiento es de tipo instrumental. Los protocolos más utilizados en este contexto utilizan las llamadas *cajas de Skinner*, que poseen una palanca que al ser accionada por el animal le proporciona una recompensa. Siguiendo con ejemplo, si colocamos un macho de rata en una de estas cajas y cuando por azar activa la palanca, aparece una hembra receptiva, el macho aprenderá a apretar la palanca con regularidad para obtener su recompensa (Everitt, 1989). De esta manera, la presencia de una *recompensa* da lugar a un *refuerzo* de la respuesta emitida (Skinner, 1953), es decir, a un aumento de la probabilidad de que se exprese un comportamiento muy improbable (apretar la palanca).

Finalmente, para estudiar el refuerzo en el laboratorio se pueden utilizar tres tipos de recompensas, unas naturales (comida, agua, sexo), y otras dos de carácter artificial, como son las drogas adictivas y la autoestimulación eléctrica intracerebral. Se supone que estos dos últimos tipos de recompensas artificiales deben estar actuando sobre los circuitos neurales subyacentes al procesado de las primeras, dado que son capaces de provocar el mismo tipo de respuestas.

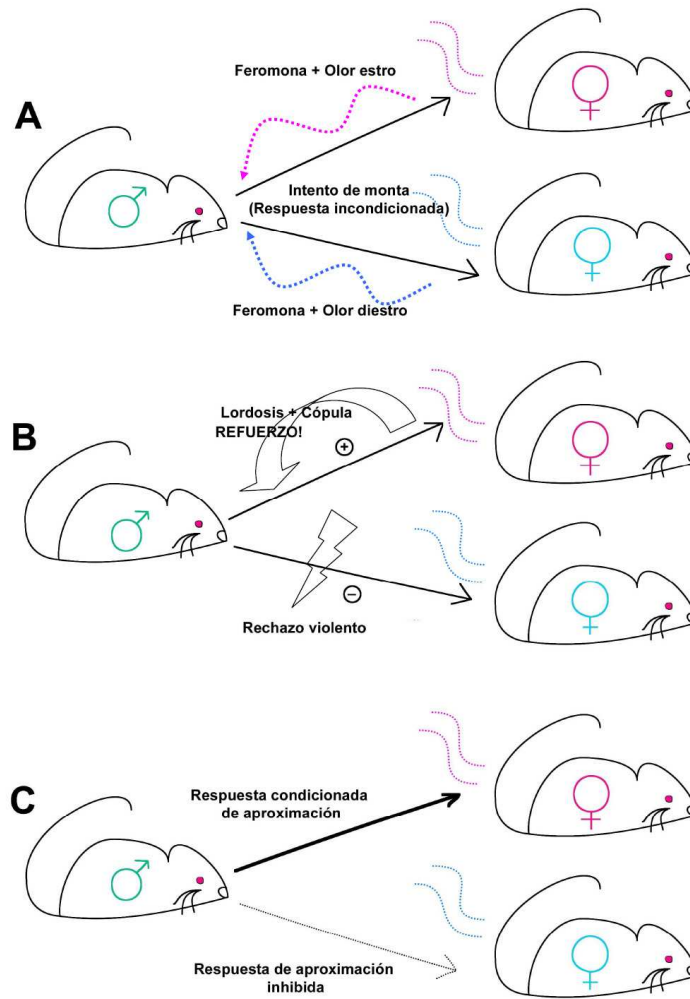


Figura 1. Esquema de un ejemplo de aprendizaje inducido por refuerzo.

A. Los machos vírgenes de rata muestran una respuesta incondicionada de monta hacia cualquier congénere hembra, independientemente de su estado hormonal, asociado a un olor característico inicialmente neutro. B. El olor de la hembra en estro se asocia con la respuesta de cópula, una recompensa natural para el macho, que refuerza el comportamiento de aproximación hacia estas hembras. Por el contrario, el olor a diestro se asocia con un rechazo violento, que debilita la respuesta de aproximación hacia estas hembras. C. El olor a estro induce una respuesta condicionada de aproximación, mientras que el olor a diestro inhibe la respuesta de aproximación.

1.1.1 La circuitería neural clásica del refuerzo

La primera cita acerca de las vías neurales que controlan los procesos de refuerzo la constituyen los experimentos clásicos de autoestimulación cerebral de Olds y Milner (1954), que demostraron que ratas con un electrodo implantado crónicamente en determinadas áreas cerebrales aprendían rápidamente a presionar una palanca que hacía pasar corriente a través del electrodo, como si encontrasen placentera esta estimulación. Las áreas que daban lugar a mayores tasas de respuesta utilizando menores intensidades se encontraban en el tracto prosencefálico medial (*medial forebrain bundle, MFB*) (Olds *et al.*, 1960; Corbett y Wise, 1980), por el cual discurren los axones de las neuronas de los núcleos mesencefálicos que inervan el prosencéfalo rostral.

Este importantísimo hallazgo de que la estimulación eléctrica en ciertos núcleos cerebrales constituía un estímulo reforzante dio lugar a la idea de que la liberación de los neurotransmisores propiciada por esta estimulación sería la responsable del refuerzo. La primera hipótesis en esta línea implicaba a la noradrenalina como “neurohormona del sistema del refuerzo” (Poschel, 1963). Sin embargo, la atención de los investigadores se centró muy pronto en la dopamina. Esto fue propiciado, en primer lugar, por el hallazgo de que las neuronas de los núcleos tegmentales, cuyos axones ascendían por el citado tracto prosencefálico medial, contenían dopamina (Dahlstrom y Fuxe, 1964). Por otro lado Ungersted (1971) demostró que las lesiones del tracto nigro-estriatal dopaminérgico dejaban a los animales adípsicos y afágicos, lo que sugería que esta vía neural era crítica para mantener el valor recompensante de los alimentos y el agua. Por último, Roy Wise y su

grupo (Wise *et al.*, 1978; Wise y Schwartz, 1981) demostraron que los *neurolepticos* (que farmacológicamente antagonizan la acción de la dopamina) disminuían el efecto de las recompensas naturales (comida) en el aprendizaje instrumental (palanqueo). En este contexto se enunció la primera hipótesis sobre la dopamina y el refuerzo, conocida como la *hipótesis de la anhedonia* (Wise y Rompré, 1989), de acuerdo con la cual la liberación de dopamina en el estriado (específicamente en el estriado ventral) desde los terminales tegmentales sería responsable de la sensación hedónica inducida por los estímulos reforzantes naturales y artificiales. Así, esta teoría propone que la disminución de las tasas de respuesta para obtener una recompensa bajo tratamiento con los neurolepticos se debe a un estado de *anhedonia* provocada por los mismos (Wise *et al.*, 1978). Desde entonces, el número de publicaciones sobre este tema se ha ido incrementando de manera espectacular. A este respecto, apunto un dato como simple curiosidad: cuando introduje en la inevitable base de datos del National Institute of Health (mientras escribía esta Introducción a mediados de 2007), las palabras “dopamine + reward”, obtuve un ingente número de 2233 artículos, muy lejos de los 774 que obtuve mediante la misma búsqueda para los opiáceos o los 254 de noradrenalina.

La hipótesis de la *anhedonia* se vio muy reforzada por el enorme poder adictivo de las drogas agonistas de la dopamina, tales como las anfetaminas y sus derivados y la cocaína. De acuerdo con esta hipótesis, los agonistas de dopamina aumentarían el efecto hedónico de los estímulos reforzantes y constituirían, por sí mismos, estímulos muy reforzantes. Como consecuencia, su autoadministración sería reforzada

por la propia droga, por lo que desencadenaría de inmediato una adicción a la misma.

El siguiente paso fue intentar conciliar con la hipótesis dopaminérgica de la *anhedonia* las adicciones hacia otras drogas de abuso (ver Koob y LeMoal, 2006), como los mórnicos, los tranquilizantes, el alcohol o la nicotina. Los datos experimentales indicaron pronto que todas estas drogas facilitaban la actividad dopaminérgica en el estriado ventral actuando en el propio estriado ventral o potenciando la actividad de las neuronas tegmentales (ver Spanagel y Weiss, 1999) (Figura 2).

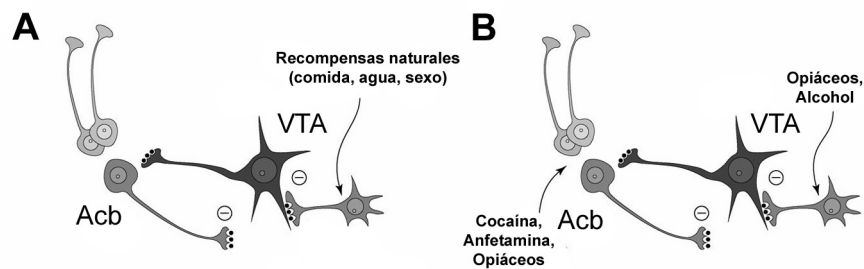


Figura 2. Esquema de la vía dopaminérgica tegmento-estriatal como responsable clásica del refuerzo.

A. Las recompensas naturales (comida, agua, sexo) acceden al área ventral tegmental por sus aferencias sensoriales. B. Las drogas de abuso estimulan directamente los receptores opiáceos y dopaminérgicos en el área ventral tegmental y el núcleo accumbens. Abreviaturas: Acb: núcleo accumbens; VTA: área ventral tegmental. Adaptado de Spanagel y Weiss, (1999).

1.1.2 La crisis de la hipótesis dopaminérgica de la anhedonia

A pesar de las evidencias expuestas, la hipótesis sobre el papel de la dopamina en las propiedades hedónicas de los estímulos reforzantes entró en una grave crisis. Las causas de esta crisis hay que buscarlas en evidencias de tipo farmacológico-comportamental y electrofisiológico. Por una parte, el uso de paradigmas comportamentales instrumentales para el estudio del refuerzo plantea dudas acerca de los verdaderos

efectos de los antagonistas de la dopamina sobre los mismos. Como hemos visto, el refuerzo de un comportamiento instrumental requiere de un estímulo con un componente hedónico (lo que Berridge y colaboradores denominan el *liking*, ver Berridge y Robinson, 2003) que refuerce las asociaciones estímulo-respuesta que lo preceden, es decir que aumente la motivación del animal por trabajar para conseguir el refuerzo (el *wanting*, según Berridge y colaboradores), expresando un comportamiento dado (apretar la palanca) en respuesta a estímulos predictores del refuerzo (p.e. la propia palanca en el contexto de la caja de Skinner). Por lo tanto, cuando una droga (como los neurolépticos) disminuye la adquisición de un aprendizaje instrumental puede ser que esté afectando al valor hedónico del estímulo recompensante (como predecía la hipótesis de la *anhedonia*) o que este interfiriendo con los mecanismos de la motivación (*wanting*) conducentes al refuerzo de las asociaciones estímulo-respuesta. Este simple hecho cuestiona la interpretación de todos los experimentos acerca del refuerzo basados en paradigmas instrumentales, dado que sugiere que algunos de los tratamientos que disminuyen el refuerzo de comportamientos como el palanqueo pueden no estar afectando al valor hedónico del premio utilizado.

En un intento por aclarar este punto, Berridge (ver Berridge, 2000) decidió estudiar el efecto de los neurolépticos en un comportamiento innato relacionado con las propiedades hedónicas de un reforzante natural. Para ello aprovechó la descripción que Grill y Norgren (1978) habían realizado sobre las expresiones faciales de la rata en respuesta a la degustación de soluciones sápidas. Según estos autores,

una serie de reflejos oromotores desencadenaban movimientos de la lengua y los labios de la rata que resultaban en el paladeo e ingestión de soluciones dulces (sacarosa o sacarina) y en el rechazo de soluciones amargas o ácidas. Este tipo de reacciones son innatas y están presentes en mamíferos de diversas especies incluidos los simios y los recién nacidos humanos (Steiner, 1974; Steiner y Glaser., 1995). Usando esta expresividad facial, Berridge valoró el impacto hedónico de soluciones dulces en ratas control y en ratas tratadas con neurolépticos y otras drogas. Sus resultados le llevaron a la conclusión de aunque los neurolépticos retrasan y disminuyen el palanqueo conducente a obtener comida o golosinas, no afectan al impacto hedónico del sabor dulce, puesto que los animales con lesiones del sistema dopaminérgico (Berridge y Robinson, 1998) muestran expresiones faciales de placer, degustación e ingestión similares a los animales control. Con ello concluyó que la dopamina está implicada en los aspectos motivacionales (el *wanting*) del refuerzo, pero no en los hedónicos (*liking*), rechazando así la hipótesis clásica de la *anhedonia* y la dopamina.

Si bien este punto de vista se ha impuesto y es mayoritariamente aceptado hoy en día (incluso Roy Wise, padre de la teoría de la *anhedonia* ha ido variando sus posiciones; ver Wise, 2004), hay que señalar que la independencia entre dopamina y *hedonia* tan sólo se ha podido demostrar en el caso de los sabores dulces, al no haberse desarrollado ningún otro paradigma no instrumental del refuerzo (equivalente a la expresividad facial frente al sabor dulce). Para la aceptación cabal de la hipótesis del papel de la dopamina en el *wanting*, habría que demostrar que el impacto hedónico de otros estímulos reforzantes naturales tampoco se ve

afectado por antagonistas de la dopamina o lesiones de los sistemas dopaminérgicos.

La búsqueda de un nuevo paradigma no instrumental para el estudio del papel de la dopamina en las propiedades hedónicas y la motivación requiere de la selección de un estímulo recompensante apropiado, diferente del sabor dulce. Como hemos visto, los estímulos naturales que constituyen una recompensa para los animales son mayoritariamente de dos tipos, a saber, los relacionados con la ingesta por un lado, y los relacionados con el contacto sexual (o incluso social en ciertas especies) por otro. Estos estímulos poseen propiedades hedónicas intrínsecas que, como hemos visto, refuerzan el aprendizaje de determinadas respuestas orientadas a conseguirlos.

Evidentemente, los estados motivacionales internos del animal van a condicionar tanto el valor de un estímulo para actuar como recompensa como la energía que empleará para la consecución de la misma. Por ejemplo, un animal hambriento estará muy motivado por la consecución de alimento, y por lo tanto un simple trozo de pienso actuará como una recompensa que provocará el rápido aprendizaje de una respuesta de palanqueo para obtenerlo. Por el contrario, si el animal se encuentra saciado, es posible que el pienso no constituya recompensa alguna para él, y necesitemos utilizar cereales chocolateados para que aprenda la respuesta requerida.

Respecto al comportamiento sexual, los condicionantes internos no son menores. Por ejemplo, en hembras la apetencia por el contacto sexual se reduce al estado hormonal del estro. Por otra parte, la implicación de un compañero sexual (cuya motivación también es

variable) hace difícil diseñar un paradigma no instrumental suficientemente sencillo para el estudio del refuerzo sexual.

Frente a estos problemas, nos preguntamos si las feromonas sexuales, un estímulo íntimamente relacionado con el comportamiento sexual y muy importante para la comunicación intraespecífica en animales macrosmáticos como el ratón, podrían ser utilizadas como una recompensa alternativa para estudiar los mecanismos del refuerzo. De hecho, las feromonas sexuales de macho de ratón son innatamente atractivas para las hembras, lo cual se demuestra mediante el hecho de que hembras que nunca han estado en contacto con machos ni sus secreciones ni excreciones (en adelante, *hembras químicamente vírgenes*) investigan de manera muy intensa y preferente las feromonas contenidas en viruta utilizada por machos, cuando se presenta frente a señales químicas de hembras (Moncho-Bogani *et al.*, 2002). Es más, estas propiedades atractivas no dependen del estado hormonal del animal (Mossman y Drickamer 1996; Moncho-Bogani *et al.*, 2004).

De esta manera, el uso de feromonas sexuales como recompensa presentaría diversas ventajas claras frente a otros estímulos sexuales para estudiar los procesos del refuerzo. En primer lugar, el carácter atractivo innato de las mismas hace que podamos estudiar sus probables propiedades hedónicas innatas sin que interfieran los procesos de aprendizaje asociados. Esto puede resultar muy valioso para resolver la controversia actual acerca del papel de la dopamina en las diversas componentes del refuerzo (Berridge y Robinson, 2003), como discutiremos extensamente a lo largo del punto 4.1. Adicionalmente, el comportamiento de exploración de las feromonas contenidas en el

sustrato es muy sencillo, siendo fácil de registrar y analizar (ver Material y Métodos). Por último, la independencia del estado del ciclo estral elimina la influencia de un componente motivacional, ya que éste no varía a lo largo del ciclo de las hembras. Conozcamos pues a continuación qué son las feromonas y si efectivamente constituyen una recompensa para las hembras.

1.2 LAS FEROMONAS SEXUALES COMO ESTÍMULO REFORZANTE NATURAL

1.2.1 ¿Qué son las feromonas?

Proponemos la designación feromona (...) derivada del griego pherein, transferir; hormon, excitar. Las feromonas se definen como sustancias secretadas hacia el exterior por un individuo y recibidas por un segundo individuo de la misma especie, en el cual provocan una reacción específica, por ejemplo, un comportamiento definido o un proceso de desarrollo (...) Incidentalmente, la actividad específica de especie no se requiere; cierto solapamiento entre especies relacionadas estrechamente puede ocurrir.

De esta manera acuñaban el término *feromona* Karlson y Lüscher en 1959, incluyendo en esta categoría aquellas sustancias químicas que provocaban cambios espectaculares en la conducta de algunos insectos, crustáceos e incluso peces; con algo más de reserva también las sustancias para el marcaje del territorio empleadas por los carnívoros. Aunque se proponen otras definiciones alternativas para las moléculas olfativas y/o vomeronasales que median la comunicación intraespecífica (McClintock, 2002), sin duda es el término *feromona* el más ampliamente usado y conocido tanto por la comunidad científica como por el público en general. Dentro de esta función general de posibilitar la comunicación intraespecífica, McClintock (2002) clasifica las feromonas según sus efectos sobre los individuos receptores, encuadrándolas en tres

categorías (esta autora propone una cuarta que no nombramos por no parecernos relevante):

- a) *Feromonas desencadenantes*: provocan respuestas estereotipadas como pudiera ser la erección (Sachs, 1997), o la búsqueda del pezón de la madre (Schaal *et al.*, 2003).
- b) *Feromonas cebadoras*: aquéllas que dan lugar a cambios neuroendocrinos o del desarrollo en el individuo receptor; por ejemplo las feromonas de macho que provocan la inducción del estró en hembras (el llamado *efecto Whitten*, Whitten, 1966)
- c) *Feromonas señalizadoras*: informan al receptor acerca de las características del individuo que las secreta; un ejemplo serían los péptidos asociados al complejo principal de histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex*, MHC), que además de su función inmunológica han sido recientemente descritas como la *firma química* del individuo (Leinders-Zufall *et al.*, 2004).

Esta clasificación de las feromonas no parece tener en cuenta su capacidad para actuar como recompensas para los individuos. De hecho, cuando se iniciaron los trabajos que constituyen la presente tesis doctoral, este punto había sido sugerido (Wysocky *et al.*, 1982; Beauchamp *et al.*, 1983, 1985) pero no se poseían evidencias concluyentes (Coppola y O'Connell, 1988). Así pues, el primer paso en la construcción de un modelo para el estudio del refuerzo utilizando feromonas fue demostrar que, realmente, las feromonas sexuales constituyen un estímulo reforzante por sí mismas, independiente del encuentro sexual.

1.2.2 ¿Son reforzantes las feromonas sexuales?

El primer requisito que deben cumplir las feromonas para poder actuar como un estímulo reforzante es que resulten atractivas para el animal. Así, la atracción innata que las hembras de ratón sienten hacia las feromonas sexuales de macho, que tiene su expresión comportamental en la preferencia de las hembras por investigar viruta ensuciada por machos ya sea frente a viruta limpia, viruta ensuciada por hembras o viruta ensuciada por machos castrados, cuando se presentan estos estímulos en recipientes colocados en lados opuestos de una caja de experimentación (Moncho-Bogani *et al.*, 2002; Martínez-Ricós *et al.*, 2007), proporciona una primera pista sobre su carácter reforzante. Sobre este punto se centra una de las observaciones críticas que más a menudo hemos recibido, ya que se puede argumentar que el comportamiento de preferencia podría deberse a un mero efecto novedad, siendo que los roedores tienden a explorar ambientes y estímulos nuevos (Berlyne, 1950; Hughes, 1965), que a su vez son reforzantes (Bardo *et al.*, 1996; Bevins *et al.*, 2002). Sin embargo, la preferencia por viruta ensuciada por machos es sostenida durante cuatro días de exposición repetida, cuando el estímulo ya no es nuevo (Martínez-Ricós *et al.*, 2007). Es más, cuando se impide el contacto con la viruta mediante una plataforma perforada que sólo permita la detección de los olores volátiles que emanan de la misma, y que son igualmente novedosos, la preferencia no se expresa (Moncho-Bogani *et al.*, 2002).

No obstante, la demostración definitiva de que las feromonas sexuales de macho son reforzantes por sí mismas la constituyó el trabajo

realizado por Martínez-Ricós y colaboradores (2004; 2007), que consiguieron establecer una preferencia de lugar condicionada en hembras vírgenes utilizando viruta ensuciada por machos como recompensa. Si bien otros estímulos similares, como la viruta ensuciada por hembras o machos castrados, son explorados intensamente por las hembras de ratón, no son capaces de inducir preferencia condicionada de lugar.

1.2.3 Anatomía del sistema de detección de las feromonas

Existe una controversia, digamos encarnizada, sobre el papel de los sistemas olfativo y vomeronasal en la comunicación intraespecífica mediada por feromonas (Restrepo *et al.*, 2004; Baxi *et al.*, 2006). Así, el sistema vomeronasal es enormemente importante para la comunicación intraespecífica de una amplia variedad de animales macrosmáticos, que incluyen tanto reptiles como mamíferos (pero no las aves, en las cuales además se ha producido una reducción drástica adicional del sistema olfativo). Por otro lado, en ciertas especies de mamíferos el sistema vomeronasal se encuentra muy reducido o ha desaparecido por completo, asumiéndose por tanto que la comunicación química entre los individuos depende exclusivamente, si la hay, del sistema olfativo. Entre estas últimas se encontrarían, por ejemplo, los simios y los humanos.

Con este trabajo no pretendemos solventar estas cuestiones; sino simplemente utilizar las feromonas contenidas en la viruta ensuciada por machos como estímulo atractivo y reforzante para las hembras de ratón. Las hembras expresan, como ya sabemos, preferencia hacia la viruta

ensuciada por machos cuando se les permite el acceso directo a la misma, pero no hacia los olores volátiles que emanan de la misma (Moncho-Bogani *et al.*, 2002). Este carácter no volátil de las feromonas innatamente atractivas contenidas en la viruta ensuciada por machos ya apuntaba a que al menos estos estímulos debían ser detectados por el sistema vomeronasal (Wysocky *et al.*, 1980). Este punto que acaba de ser demostrado por Martínez-Ricós y colaboradores (*in press*), al demostrar que una lesión electrolítica del bulbo olfativo accesorio en hembras *químicamente vírgenes* previene la expresión comportamental de la atracción innata por feromonas de macho.

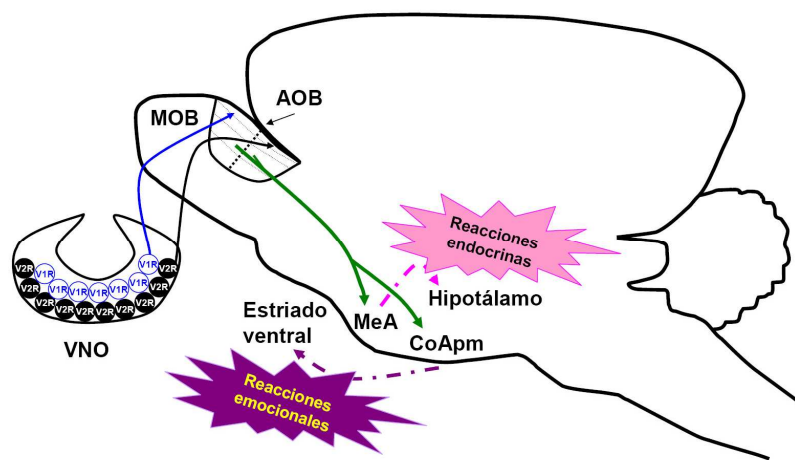


Figura 3. Esquema simplificado de la anatomía del sistema vomeronasal en el encéfalo del ratón.

Modificado a partir de Halpern y Martínez-Marcos (2003). Abreviaturas: AOB: bulbo olfativo accesorio; CoApm: amígdala posteromedial cortical; MeA: amígdala medial; MOB: bulbo olfativo principal; VNO: órgano vomeronasal; V1R: receptor vomeronasal de tipo 1; V2R: receptor vomeronasal de tipo 2.

El sistema vomeronasal está compuesto, en primer lugar, por el órgano vomeronasal u órgano de Jacobson, ubicado en la cavidad nasopalatina en el ratón. Esta localización no permite que las sustancias

puedan ser detectadas por el simple paso del flujo de aire, como sucede en el epitelio olfativo, sino que deban ser introducidas en el mismo mediante un mecanismo de bombeo activo (Meredith y O'Connell, 1979).

El epitelio sensorial del órgano vomeronasal contiene células apicales y basales, que se diferencian en la expresión de receptores vomeronasales diferentes y en sus proyecciones específicas a las porciones anterior y posterior, respectivamente, del bulbo olfativo accesorio (Figura 3) (Halpern y Martínez-Marcos, 2003).

Las neuronas mitrales del bulbo olfativo accesorio proyectan a través del tracto olfativo accesorio a los núcleos posteromedial cortical y medial de la amígdala, así como al núcleo del lecho de la *stria terminalis* y el núcleo del lecho del tracto olfativo accesorio (von Campenhausen y Mori, 2000). Los tres primeros núcleos proyectan, de manera directa e indirecta, a los núcleos hipotalámicos importantes para el comportamiento reproductor, como el ventromedial hipotalámico y el área preóptica medial; estas proyecciones controlan las reacciones neuroendocrinas provocadas por la detección de feromonas (Pitkanen, 2000). Además, el núcleo posteromedial cortical proyecta de manera directa e indirecta, a través del área amígdalo-hipocámpica, sobre zonas específicas del estriado ventral, proporcionando el sustrato neural que podría codificar las propiedades reforzantes de las feromonas, como veremos enseguida (Novejarque, 2007; Úbeda-Bañón *et al.*, 2008) (Figura 3). Así pues, el uso de feromonas nos proporciona una última ventaja frente a otros estímulos reforzantes, cuya señalización, como hemos visto en la Figura 2, se supone tiene lugar por la activación de la vía

tegmento-estriatal dopaminérgica (Spanagel y Weiss, 1999). Esta ventaja es la posibilidad de investigar más a fondo el papel de una estructura cerebral clave en el aprendizaje emocional (LeDoux, 2000), pero que además recibe la información feromonal de manera muy directa. Dicha estructura es, por supuesto, la amígdala.

1.3 AMÍGDALA Y REFUERZO

La amígdala (del griego, *amygdala*, almendra) es una estructura telencefálica profunda en el lóbulo temporal humano; en general puede identificarse como una protuberancia en la parte caudoventral del telencéfalo de la mayoría de los mamíferos. Se atribuye su primera descripción, a principios del siglo XIX, al médico alemán Karl Friedrich Burdach (Burdach, 1819-1822; citado por Swanson y Petrovich, 1998). La descripción original se refería fundamentalmente a lo que hoy conocemos como la división basolateral de la amígdala; posteriormente otros neuroanatomistas como Herrick (1921) y Johnston (1923) sugirieron la estrecha relación del sistema olfativo con la formación amigdalina. De hecho, fue Johnston quien introdujo la descripción de la amígdala más utilizada hoy en día, basándose en un análisis comparado entre distintos vertebrados.

Así, la amígdala de los mamíferos, tal como la conocemos hoy, consta de dos divisiones de origen palial (basolateral y cortical) y dos subpaliales (central y medial, aunque una parte de esta última podría ser de origen palial, García-López *et al.*, 2008) (Martínez-García *et al.*, 2007). Cada una de estas divisiones recibe aferencias de una variedad de núcleos sensoriales y asociativos, pero además existe una intrincada red de conexiones intraamigdalinas (Pitkänen *et al.*, 1997). La Figura 4 muestra las propiedades hodológicas de la amígdala. Señalamos especialmente, por su relevancia para la comprensión de la presente tesis doctoral, las aferencias olfativas y vomeronasales: partes de la división cortical de la amígdala, como son la parte anterior y la posterolateral reciben aferencias

directas de los bulbos olfativos principales, mientras que la parte posteromedial de la amígdala cortical así como la división medial son innervadas por los bulbos olfativos accesorios (Scalia y Winans, 1975).

En cuanto a las funciones que desempeña la amígdala, la más investigada ha sido sin duda su implicación en repuestas de tipo emocional, sobre todo de miedo y aversión (LeDoux, 2000). La expresión de estas repuestas está controlada por las proyecciones de la división central de la amígdala al tronco cerebral e hipotálamo (LeDoux et al., 1988) (Figura 4). Estudiada en menor profundidad, aunque también de gran importancia, es la función de la amígdala en la atracción y el refuerzo (Everitt *et al.*, 1999; Baxter y Murray, 2002). Así, a la división basolateral de la amígdala llega la información, vía proyecciones corticales, de los sistemas sensoriales que tienen su relevo en el tálamo (visual, auditivo y somatosensorial), así como aferencias desde el sistema gustativo (Pitkanen, 2000) (Figura 4). A su vez, la división basolateral inerva de manera masiva el estriado ventral. La importancia de las proyecciones amígdalo-estriatales para el refuerzo ha sido estudiada en detalle por el grupo de Everitt, que ha demostrado su implicación en las repuestas provocadas por una amplia variedad de recompensas, como por ejemplo el control de la repuesta instrumental por estímulos condicionados a recompensas de tipo sexual (Everitt *et al.*, 1989), la expresión de preferencia de lugar condicionada por sacarosa (Everitt *et al.*, 1991) y los fenómenos de adicción (Everitt *et al.*, 1999). Este papel en los comportamientos emocionales ha desembocado en la definición de la amígdala como centro del cerebro emocional.

Por otra parte, como hemos visto, la amígdala cortical y la medial constituyen principalmente núcleos olfativos/vomeronasales, aunque la amígdala medial participa también en respuestas de miedo incondicionado, principalmente por sustancias químicas de predadores (Choi *et al.*, 2005; Takahashi, 2007).

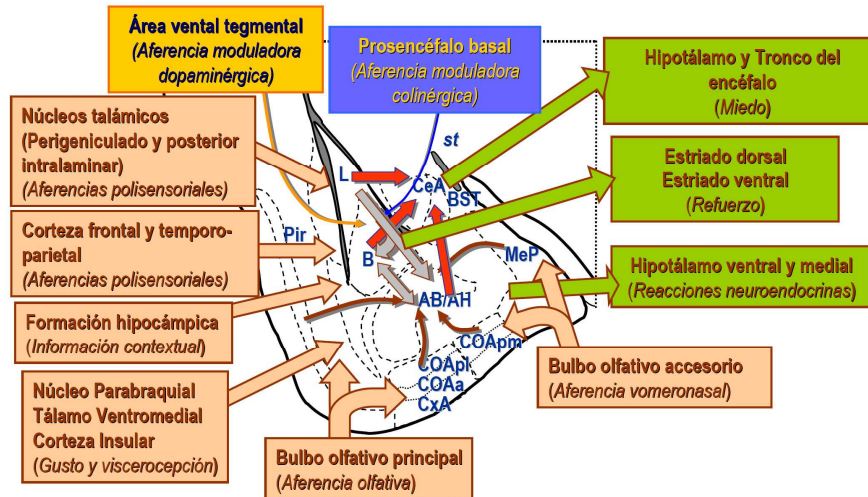


Figura 4. Esquema de las principales aferencias y eferencias de la amígdala de mamíferos.

Adaptado de Martínez-García *et al.*, 2007.

Esta funcionalidad aparentemente no relacionada, unida al origen embrionario múltiple, han llevado a algunos científicos a cuestionarse si realmente el término amígdala tiene validez. De hecho, Swanson y Petrovich dicen en su revisión de 1998: “*Términos como “amígdala”...combinan grupos celulares de manera arbitraria...la amígdala no es ni una unidad funcional ni estructural*”. Su visión es que la amígdala está formada por núcleos que pertenecen a cuatro sistemas funcionales, a saber, vomeronasal, olfativo, autonómico y frontotemporal (Figura 5A).

Una visión alternativa, sostenida por McDonald (2003), propone que la amígdala propiamente dicha (como fue originariamente definida por Burdach, ver arriba) sea la formada por las divisiones de origen palial, es decir, la amígdala corticobasolateral, que funcionaría como un interfaz entre la información sensorial y su valor emocional, mediante sus proyecciones al estriado ventral (Everitt *et al.*, 1999). Por otra parte, este autor considera las porciones subpaliales, de carácter estriatal (amígdala central y medial), y la amígdala extendida en general, como un sistema estriatopalidal (conceptos revisados en de Olmos y Heimer, 1999), implicado sólo en algunas funciones de la amígdala como son el miedo y el estrés.

Contrariamente a estos puntos de vista, el grupo de investigación dentro del cual se ha desarrollado la presente tesis doctoral sostiene que la función quimiosensorial de la amígdala debe estar estrechamente relacionada con su función emocional, ya que la estructura básica de la amígdala se encuentra conservada en todos los tetrápodos amniotas (Martínez-García *et al.*, 2007; 2008; Lanuza *et al.*, 2008). Esta propuesta, como queda esquematizada en la Figura 5B, es que la amígdala puede ser subdividida en dos subsistemas funcionales. Por un lado, la amígdala central-basolateral coordina reacciones tanto innatas como aprendidas de miedo/ansiedad/aversión, a través de la amígdala central extendida, o bien de atracción/refuerzo a través de sus proyecciones al estriado ventral, hacia cualquier tipo de estímulo. Por otra parte, el subsistema medial se encuentra implicado en el mismo tipo de respuestas, pero guiadas por estímulos olfativos y vomeronasales, que producen comportamientos emocionales específicos de especie (reproductivos y

agonísticos) o defensivos (frente a predadores). Dado que ambos subsistemas pueden modularse recíprocamente, gracias a la profusa red de conexiones intraamigdalinas, ambas funciones están estrechamente relacionadas, y por lo tanto la amígdala constituye un sistema funcional.

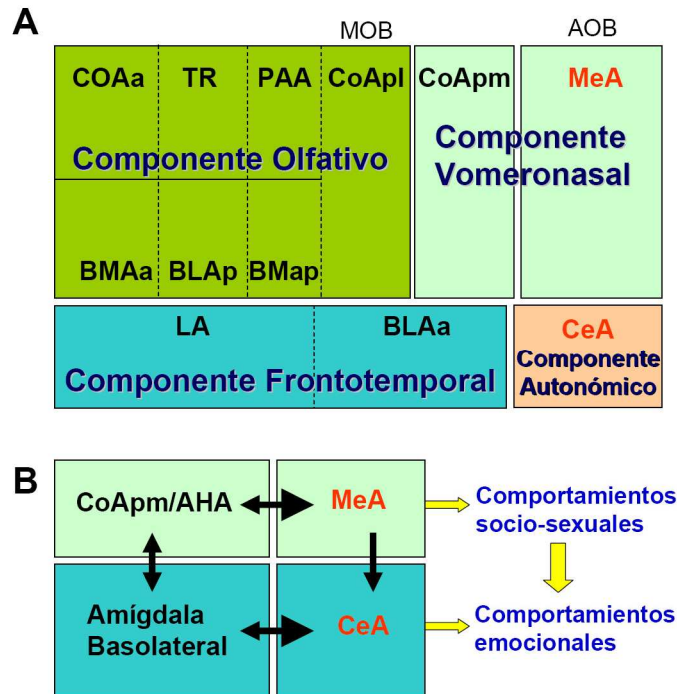


Figura 5. ¿Es la amígdala un sistema funcional?

A. Para Swanson y Petrovich, la amígdala está compuesta por núcleos sin relación anatómica ni funcional, y por lo tanto debería abandonarse el término amígdala para definir a esta agrupación. (Adaptado de Swanson y Petrovich, 1998). B. Por el contrario, para Martínez-García y colaboradores la amígdala es un verdadero sistema funcional, cuya función, muy conservada a lo largo de la evolución de los amniotas, es la de coordinar las respuestas emocionales y los comportamientos específicos de especie. (Adaptado de Martínez-García *et al.*, *in press*). Abreviaturas: AHA: área amígdalo-hipocámpica; AOB: bulbo olfativo accesorio; BLAa,p: amígdala basolateral, anterior y posterior; BMA,p: núcleo basomedial de la amígdala, anterior y posterior; CeA: amígdala central; CoApl,m: amígdala posterolateral, lateral y medial; LA: núcleo lateral de la amígdala; MeA: amígdala medial; MOB: bulbo olfativo principal; PAA: área amígdalo-piriforme; TR: área de transición post-piriforme.

Precisamente para demostrar la validez de este punto de vista, se ha ido desarrollando en nuestro laboratorio el modelo que utiliza las

feromonas sexuales de macho de ratón, un estímulo quimiosensorial, como estímulo atractivo/reforzante para las hembras de esta especie. Esta aproximación nos permite recabar datos que puedan apoyar o, en su caso, rebatir esta visión de la amígdala como sistema funcional, y estudiar la estrecha relación entre su función quimiosensorial y su función emocional, diez años después de que se pusiera en duda la validez del concepto de amígdala (Swanson y Petrovich, 1998).

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente tesis doctoral es desentrañar la neuroquímica subyacente al refuerzo inducido por feromonas en hembras de ratón. De este objetivo fundamental se derivan los siguientes:

1. Investigar, mediante una aproximación farmacológica-comportamental, la importancia de distintos neurotransmisores en la atracción innata de las hembras de ratón por feromonas sexuales de macho.
2. Estudiar la importancia de estos neurotransmisores en los procesos de aprendizaje mediados por feromonas utilizando el paradigma de la preferencia condicionada de lugar.

3. Estudiar los núcleos cerebrales donde los fármacos empleados ejercen su efecto, mediante el estudio bibliográfico de la expresión de receptores o mediante lesiones del área de interés.
4. Comparar los resultados obtenidos sobre los comportamientos provocados por la detección de feromonas sexuales con el papel de los neurotransmisores estudiados en otros refuerzos naturales, y específicamente sobre un refuerzo quimiosensorial como es el sabor dulce.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 ANIMALES

Los sujetos experimentales utilizados en la presente tesis doctoral fueron hembras de ratón albino, de la cepa CD1 (*outbred*). Se trató a los animales de acuerdo con las directrices del Consejo de la Comunidad Europea (24 de Noviembre 1986 [86/609/EEC]) y los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Ético de la Universitat de València.

En primer lugar, para investigar los mecanismos innatos de atracción por feromonas sexuales de macho, es necesario criar a las

hembras de manera que nunca estén en contacto directo con machos adultos ni con sus secreciones o excreciones. Por ello, estabulamos hembras preñadas en una habitación limpia y sin machos adultos. Diecinueve días después del parto, antes de la pubertad, las camadas se revisan, se retiran los machos, y las hembras (en adelante, *hembras químicamente vírgenes*, ver Moncho-Bogani *et al.*, 2002) se agrupan (4-8 animales por jaula) con comida y agua *ad libitum* hasta que son utilizadas en los experimentos cuando alcanzan la edad adulta. Las hembras de ratón empiezan a expresar preferencia por las feromonas de macho adulto una vez han alcanzado la madurez sexual (Drickamer, 1989), por tanto los sujetos utilizados en los experimentos tenían una edad comprendida entre las nueve y las dieciséis semanas, y su peso oscilaba entre los 25-35 gramos.

Por otro lado, los ratones utilizados en los experimentos de condicionamiento de preferencia de lugar, preferencia por sacarosa y discriminación olfativa fueron hembras vírgenes del mismo peso y edad compradas a una casa comercial (Harlan Ibérica, Barcelona). En todo caso se utilizaron tras al menos dos semanas de habituación a nuestro estabulario.

3.2 FÁRMACOS

Para llevar a cabo un rastreo de la neuroquímica subyacente a los procesos de interés, utilizamos la administración sistémica de fármacos agonistas y antagonistas de los distintos neurotransmisores que pudieran ser importantes para la expresión de los comportamientos inducidos por feromonas sexuales de macho en hembras de ratón. Los fármacos elegidos son de uso común en estudios de neurociencia comportamental y se recopilan en la Tabla 1 junto con sus propiedades según son facilitadas por el proveedor, Sigma-Aldrich (Madrid).

Todos ellos se diluyeron en solución salina (NaCl 0.9% en agua destilada), excepto el sulpiride, disuelto en salino acidificado con ácido acético y neutralizado después con NaOH 0.1M.

3.2.1 Elección de las dosis

Para elegir las dosis adecuadas de cada fármaco, en primer lugar se realizó una búsqueda exhaustiva en PubMed sobre estudios en ratón y rata que implicaran alguna medida de comportamiento (insertaremos sólo algunas de las referencias seguidas en los capítulos correspondientes, debido a su excesivo número).

TIPO DE FÁRMACO	NOMBRE	NOMBRE ABREVIADO	PROPIEDADES
Dopaminérgico	R(+)-7-Chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine hydrochloride	SCH 23390	Antagonista selectivo de los receptores D1 de dopamina.
	(S)-5-Aminosulfonyl-N-[(1-ethyl-2-pyrrolidinyl)methyl]-2-methoxybenzamide	Sulpiride	Antagonista del receptor D2 de dopamina. Antipiscótico.
	(±)-7,8-Dihydroxy-3-allyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine hydrobromide (±)-SKF-77434 hydrobromide	SKF 38393	Agonista del receptor D1 de dopamina.
	trans-(−)-(4aR)-4,4a,5,6,7,8,8a,9-Octahydro-5-propyl-1H-pyrazolo[3,4-g]quinoline monohydrochloride	Quinpirol	Agonista dopaminérgico con gran afinidad por los receptores D2 y D3. Se trata del agonista D2 más usado en estudios tanto <i>in vivo</i> como <i>in vitro</i> .
Noradrenérgico	17-Hydroxy-yohimban-16-carboxylic acid methyl ester hydrochloride	Yohimbina	Antagonista del receptor $\alpha 2$ de noradrenalina.
Serotonérgico	3-(2-[4-(4-Fluorobenzoyl)-1-piperidinyl]ethyl)-2,4(1H,3H)-quinazolin-5(1H)-one tartrate salt	Ketanserin	Antagonista selectivo de los receptores 5-HT2
	(±)-2,5-Dimethoxy-4-iodoamphetamine hydrochloride	DOI	Agonista selectivo de los receptores 5-HT2 de serotonina. Incrementa el recambio de dopamina.
Monoaminérgico	(+)- α -Methylphenethylamine sulfate salt	Anfetamina	Induce la liberación de catecolaminas y serotonina desplazándolas de sus vesículas de almacenamiento. Bloquea la recaptación de catecolaminas.
	Desipramine Hydrochloride	Desipramina	Inhibidor de los transportadores de noradrenalina y serotonina (más potente en el primer caso)
Opioidérgico	Naloxone Hydrochloride dihydrate	Naloxona	Antagonista competitivo de los receptores μ , κ , δ y σ . Bloquea la acción de los agonistas σ .
	N-Phenyl-N-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidinyl]-propanamide citrate salt	Fentanilo	Potente agonista de los receptores μ de opiáceos.
Nitrérgico	N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride	L-NAME	Análogo del aminoácido arginina, inhibe la producción de óxido nítrico.

Tabla 1. Fármacos utilizados en los estudios desarrollados.

A continuación se comprobó que no existían diferencias significativas entre las dosis utilizadas en ambas especies mediante un ANOVA univariante, se agruparon los estudios y se construyeron diagramas de frecuencia, de los cuales mostramos en la Figura 6, a modo de ejemplo, los correspondientes a los experimentos expuestos en el punto 4.1 (sistemas dopaminérgicos). Seguidamente elegimos la dosis utilizada con mayor frecuencia y realizamos experimentos piloto con varias dosis alrededor de la misma para elegir aquéllas que afectaban en menor medida al comportamiento general de los animales (locomoción, tiempo total de exploración, ver punto 3.5).

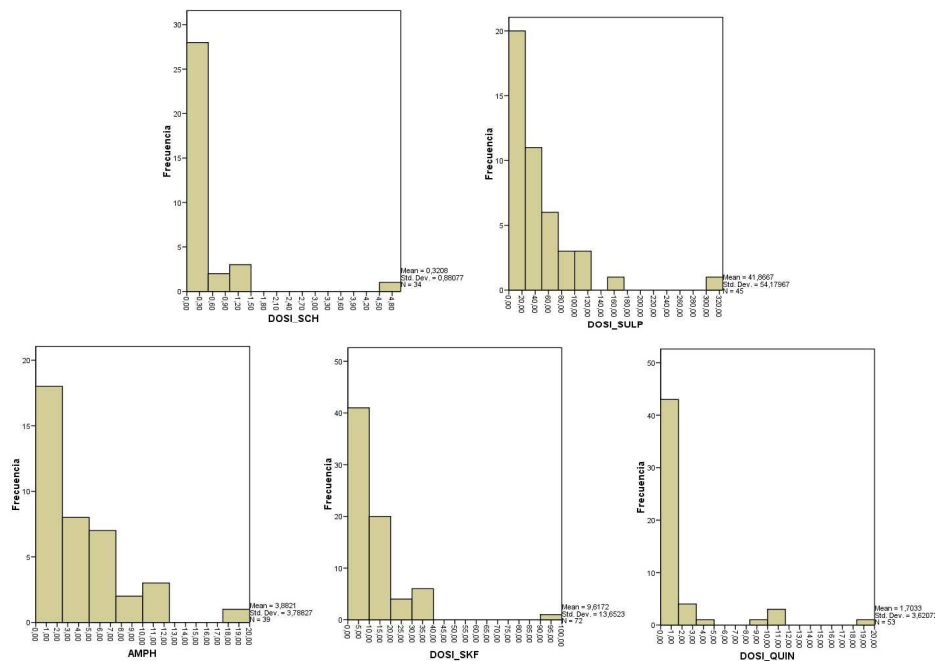


Figura 6. Diagramas de frecuencia de las dosis de drogas dopaminérgicas (aplicadas sistémicamente) utilizadas en estudios comportamentales en rata o ratón.

Los diagramas se han construido a partir de búsquedas bibliográficas en la base de datos PubMed.

3.3 CIRUGÍA

Dado que la aproximación farmacológica no nos permitía determinar los centros nerviosos en los que tenía lugar la acción de los fármacos sobre los procesos estudiados, nos planteamos llevar a cabo un experimento en el cual el objetivo fue lesionar la parte del estriado ventral a la que proyecta específicamente la amígdala vomeronasal, a saber, el límite entre el *shell* medial del accumbens y el islote de Calleja magno, así como los islotes de Calleja medio-ventrales (Novejarque, 2007, ver Introducción General).

Para ello, los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (60 mg/kg i.p.), y se les administró atropina para reducir la depresión cardiorrespiratoria (0.4mg/kg i.p.), así como un analgésico (buprenorfina, Buprex, Schering-Plough; 0.02 mg/kg, s.c.). Una vez anestesiados, los sujetos se colocaron en un aparato estereotáxico (David Kopf Instruments 963-A, Tujunga CA, EE.UU) para proceder a la cirugía.

Las coordenadas se adaptaron para la cepa CD1 a partir del atlas de Franklin y Paxinos (2001): +0.9 anterior a bregma, ± 0.3 mm desde la línea media y -4.9 mm de profundidad desde la superficie del cerebro para el grupo *Lesión* y +0.9, ± 0.3 y -3.5 para el grupo *Falsa operación*.

Se realizaron lesiones electrolíticas, haciendo pasar una corriente continua negativa de 0.8 mA durante 15 segundos a través de un electrodo de 250 μ m de diámetro, aislado por una cubierta de nylon excepto en la punta de 500 μ m. Tanto el aparato utilizado como fuente de corriente como el electrodo son productos de la compañía Ugo Basile

(Varese, Italia). La cirugía del grupo *Falsa operación* consistía simplemente en introducir el electrodo pero sin hacer pasar corriente.

3.3.1 Valoración de las lesiones

Una vez llevados a cabo los experimentos comportamentales, los animales se anestesiaron profundamente (Pentobarbital sódico, 120 mg/kg, i.p.) y se sacrificaron por perfusión intracardiaca con tampón fosfato salino 0.1M (PBS) con una bomba peristáltica (a un flujo de 5.5 ml/min durante 5 min) seguido de formaldehído al 4% en PBS 0.1M (15 min al mismo flujo). Se extrajeron los cerebros y se dejaron durante 4 horas en post-fijación a 4°C en la misma solución fijadora de formaldehído. A continuación, los cerebros así tratados se introdujeron en una solución crioprotectora de sacarosa al 30% y se mantuvieron toda la noche a 4°C. Finalmente, se realizaron cortes histológicos de 50 µm, se montaron en portas con gelatina al 0.2% y se tiñeron con azul de toluidina 1% a pH=4.3, se diferenciaron con alcohol acético, se deshidrataron en alcohol y aclararon en xileno para su montaje definitivo con Eukitt.

Una persona que desconocía el tipo de operación sufrida por los animales se encargó de valorar el alcance de las lesiones sobre estos cortes histológicos. Se consideraron válidas todas aquellas lesiones que afectaban bilateralmente a la mayor parte o a la totalidad del islote de Calleja magno, viéndose afectados en mayor o menor grado los islotes de Calleja mediales, la banda diagonal, el *shell* medial del accumbens y el tubérculo olfativo medial.

3.4 PROTOCOLOS COMPORTAMENTALES

3.4.1 Experimentos de atracción innata por feromonas de macho

En estos experimentos se utilizaron hembras *químicamente vírgenes*. Puesto que estas hembras nunca han estado en contacto directo con machos ni con sus derivados químicos, la preferencia que expresan por feromonas de macho cuando se enfrenta a feromonas de macho castrado o de hembra (Moncho-Bogani *et al.*, 2002; Martínez-Ricós *et al.*, 2007) es innata, no aprendida.

Los animales se sometieron a un protocolo de selección entre dos estímulos químicos, que llamaremos *Test de preferencia por las feromonas de macho*, consistente en introducir al sujeto experimental en una caja limpia que contiene dos recipientes, uno en cada extremo, con viruta ensuciada por congéneres, y medir el tiempo que emplea explorando cada estímulo (ver punto 3.5). Las cajas utilizadas fueron de metacrilato oscuro, de dimensiones 25 x 50 x 30 cm., fácilmente lavables con Etanol de 96° (Figura 7).

El serrín utilizado como fuente de feromonas se obtuvo de viruta usada durante 4 días por machos dominantes estabulados individualmente, o por hembras agrupadas en jaulas de 4-8 individuos. Tras la recogida, la viruta se mezclaba y congelaba para asegurar una fuente homogénea de feromonas a lo largo de cada experimento, y se

presentaba a los animales en botes de vidrio de 6 cm de diámetro y 5.5 cm de altura.



Figura 7. Caja de metacrilato empleada en los experimentos de atracción innata y preferencia de lugar condicionada por feromonas sexuales de macho. La viruta utilizada como estímulo se presentaba en botes de vidrio idénticos en los lados opuestos de la caja.

En general, para obtener unos resultados fiables en los experimentos de comportamiento es necesario minimizar el estrés que sufren los animales ante un nuevo ambiente; por ello, durante los dos días previos al inicio de los experimentos se les manipulaba con el fin de que se acostumbrasen a la caja de experimentación y al propio experimentador. El primer día del experimento, en adelante *control pre-tratamiento*, las hembras se introducían en la caja de test con ambos botes llenos de viruta ensuciada por hembras, y su comportamiento se grababa mediante una videocámara situada sobre la caja (Figura 7) para su posterior análisis. Este control se utilizó para descartar aquellas hembras que mostraban una exploración no equilibrada de la caja. Esto se hizo por dos razones: en primer lugar porque nuestro objetivo era obtener un

diseño no sesgado, en el cual los animales no mostrasen preferencia previa por ninguno de los dos lados de la caja; en segundo lugar porque este control nos permitía descartar los animales más ansiosos, que son precisamente aquellos que muestran una exploración no equilibrada (por ejemplo, por estar asustados y permanecer en uno de los botes sin atreverse a explorar el resto del ambiente), reduciendo al mismo tiempo la variabilidad y el número de animales necesarios. A tal fin, se adoptó *a priori* un criterio para descartar sujetos experimentales consistente en no utilizar aquellas hembras que pasaban más del doble del tiempo explorando un bote que el otro. En la Tabla 2 presentamos un resumen de los fármacos, dosis de cada uno de ellos y número de animales empleados en total, incluyendo aquéllos que fueron descartados por no cumplir el criterio apriorístico de exploración equilibrada de la caja. Como se puede observar, el porcentaje de animales iniciales descartados con nuestro criterio fue inferior al 5% del total.

Las hembras que superaban el control se asignaban aleatoriamente a los distintos grupos experimentales (fármaco/salino). Al día siguiente, se les administraba una inyección intraperitoneal del fármaco correspondiente, y tras un tiempo específico para la actuación de cada fármaco (ver secciones correspondientes), se las sometía a un *test de control post-tratamiento*, también con viruta de hembras en ambos lados, con el fin de comprobar si el fármaco afectaba a la ya comentada exploración equilibrada de la caja. Tras este test, las hembras descansaban cinco minutos y a continuación se introducían en otra caja idéntica, pero esta vez con viruta de macho en uno de los lados, para

realizar el *test de preferencia por las feromonas de macho*. Todos los tests tenían una duración de cinco minutos.

	Experimentos farmacológicos de atracción innata por feromonas de macho	Fármaco	Dosis (mg/kg)	n
1. Sistemas catecolaminérgicos	Experimento 1.A.1 Efecto de antagonistas específicos de los receptores D1 y D2 de la dopamina	Salino		12
		SCH 23390 Antagonista D1	0,02	9
			0,05	8
	Experimento 1.A.2 Efecto de la anfetamina	Sulpiride Antagonista D2	20	10
		Salino		12
		Anfetamina Agonista indirecto de la dopamina	0,5	10
	Experimento 1.A.3 Efecto de agonistas específicos de los receptores D1 y D2 de la dopamina		2	8
		Salino		11
		SKF 38393 Agonista D1	10	8
			20	7
	Experimento 1.D.1 Efecto de la desipramina	Quinpirol Agonista D2	0,2	7
			1	8
		Salino		10
	Experimento 1.D.2 Efecto de la yohimbina	Desipramina Agonista indirecto de la noradrenalina	10	11
		20	11	
Salino			12	
	Yohimbina Antagonista de los receptores α_2 de noradrenalina	1	12	
	<i>Descartadas</i>		38	
2. Sistemas opioidérgicos	Experimento 2.B.1 Efecto de la naloxona	Salino		8
		Naloxona Antagonista general opiáceo	1	9
			10	8
	Experimento 2.B.2 Efecto del fentanilo	Salino		10
		Fentanilo Agonista de los receptores μ -opiáceos	0,1	9
			0,5	12
	<i>Descartadas</i>		19	
3. Serotonina y Óxido nítrico	Experimento 3.A.1 Efecto del ketanserin	Salino		12
		Ketanserin Antagonista de los receptores 5-HT _{2A} de serotonina	0,5	8
			1	8
			2	10
	Experimento 3.A.2 Efecto del DOI	Salino		15
		DOI Agonista de los receptores 5-HT _{2A} de serotonina	0,5	10
			1	10
	Experimento 3.B Efecto del L-NAME		2	8
		Salino		11
		L-NAME Antagonista de la síntesis de NO	50	8
		100	11	
	<i>Descartadas</i>		17	
n total				407

Tabla 2. Recopilación de las drogas, dosis y número de animales empleados en los experimentos farmacológicos para explorar la neuroquímica de la atracción innata por feromonas sexuales.

En los experimentos con animales lesionados (sección 4.4), se utilizó un protocolo similar. Tras dos días de habituación, durante el tercero se llevaba a cabo el *control* y a continuación el *test de preferencia por las feromonas de macho*. De la misma manera, los animales que pasaron más del doble del tiempo en una zona que en la otra en el *control* fueron descartados (Tabla 3).

	Grupo	n
Experimento 4. Efecto de lesión de la zona de proyección de la amígdala vomeronasal en el estriado ventral sobre la atracción innata por feromonas de macho	Control	9
	Falsa operación	8
	Lesión	7
	Descartadas	2
		total=26

Tabla 3. Número de animales empleados para explorar el efecto de la lesión de la zona de proyección de la amígdala vomeronasal sobre el estriado ventral (zona circundante del islote de Calleja magno) sobre la atracción innata por feromonas de macho.

3.4.2 Experimentos de condicionamiento de preferencia de lugar utilizando feromonas de macho como estímulo reforzante

El protocolo empleado para esta serie de experimentos fue una aproximación operante a la preferencia condicionada de lugar, basada en la propuesta inicialmente por Crowder y Hutto (1992) y adaptada por nuestro grupo (Martínez-Ricós *et al.*, 2004; 2007). Este protocolo se considera operante porque los animales deben ejercer un comportamiento, la exploración activa de cada uno de los lados, para obtener el estímulo reforzante, y lo elegimos porque, según sus creadores, proporciona unos resultados más robustos, sobre todo utilizando refuerzos naturales que implican interacción social (Crowder y Hutto, 1992). Las cajas de test son idénticas a las utilizadas en los experimentos de atracción innata (Figura 7).

Los animales se introducían en el medio de las mismas y se les permitía explorar libremente los dos lados de la caja: en uno de ellos, que contenía la *zona reforzada*, las hembras tenían acceso a un bote que contenía viruta de macho en los días de entrenamiento, mientras que en el lado opuesto se encontraba un bote que contenía viruta limpia, constituyendo la *zona no reforzada*. La mitad de los ratones de cada grupo tenía el área reforzada en la derecha de la caja y la otra mitad en la izquierda. La constancia en el lugar de entrada a la caja, así como los diversos objetos presentes en la habitación (cámara, puerta, etc.) permiten a los animales orientarse.

Como en el caso de los experimentos de atracción innata, las hembras eran manipuladas y se les permitía familiarizarse con las cajas experimentales durante los dos o tres días previos al inicio del protocolo. Éste comenzaba con un *test control*, que, como en el caso anterior, permitía descartar a los animales que mostraban una exploración no equilibrada de los lados, siguiendo el mismo criterio que en los experimentos de atracción innata. A continuación, durante cuatro días de entrenamiento, los animales podían explorar la caja durante diez minutos, presentándoseles sistemáticamente la viruta de macho en el mismo lado de la caja. El día siguiente se llevaba a cabo el *test de preferencia condicionada de lugar*, donde los animales sólo tenían acceso a viruta limpia en ambos lados de la caja. En este test, aquellos animales que hayan desarrollado preferencia por la *zona reforzada*, permanecerán más tiempo en ésta. Es decir, si el estímulo presentado es reforzante, los sujetos preferirán la zona en la que se encontraba éste durante las sesiones previas, a pesar de que en la sesión de *test de preferencia condicionada de lugar*

el estímulo reforzante no esté presente. Los distintos fármacos antagonistas se administraron inmediatamente antes de las sesiones de entrenamiento, según su tiempo de actuación, de manera que si el neurotransmisor en cuestión fuese necesario para el condicionamiento de lugar, o bien necesario para que el animal encontrara placentero el estímulo, los animales no serían capaces de desarrollar un condicionamiento de preferencia de lugar. Por último, resaltar que tanto la sesión de control como la del test de preferencia condicionada de lugar se llevaron a cabo en animales sin tratamiento farmacológico.

	Experimentos de preferencia de lugar condicionada por feromonas de macho	Fármaco	Dosis (mg/kg)	n
1. Sistemas catecolaminérgicos	Experimento 1.C Efecto de antagonistas específicos de los receptores D1 y D2 de la dopamina	Salino		10
		SCH 23390 Antagonista D1	0.05	10
		Sulpiride Antagonista D2	20	10
		<i>Descartadas</i>		16
2. Sistemas opioidérgicos	Experimento 2.C Efecto de la naloxona	Salino		14
		Naloxona	1	14
		Antagonista general de opiáceos	10	14
		<i>Descartadas</i>		8
n total				96

Tabla 4. Recopilación de las drogas, dosis y número de animales empleados en los experimentos farmacológicos para explorar la neuroquímica de la adquisición de preferencia de lugar condicionada por feromonas de macho.

3.4.3 Experimentos de discriminación olfativa

El test empleado para analizar la posible afectación olfativa en animales sometidos a tratamientos que pudiesen causar anosmia fue la *habitación-deshabitación*, un protocolo estándar para el análisis de la función olfativa (Baum y Keverne, 2002; Luo *et al.*, 2002). Este test consiste en presentaciones sucesivas y cortas de bastoncillos impregnados en vehículo primero y a continuación sustancias olorosas, y

aprovecha la curiosidad natural del animal frente a estímulos nuevos, que provocan en él una investigación intensa pero transitoria, que decae en las presentaciones sucesivas del estímulo. En nuestro caso, se utilizaron como estímulos olfativos productos químicos utilizados en la industria de perfumería y detectables por el olfato humano (Geraniol y citralva, amablemente donados por Ventós S.A., distribuidor de International Flavours and Fragrances, Inc. Barcelona.) y diluidos 1:5 en aceite mineral (Luo *et al.*, 2002) o bien orina de macho (Baum y Keverne, 2002).

Los test se llevaron a cabo en cajas de metacrilato oscuro, de dimensiones 25 x 25 x 30 cm., con un orificio a 8 cm. del suelo que permitía la introducción de bastoncillos de algodón impregnados en la sustancia olorosa correspondiente (Figura 8).

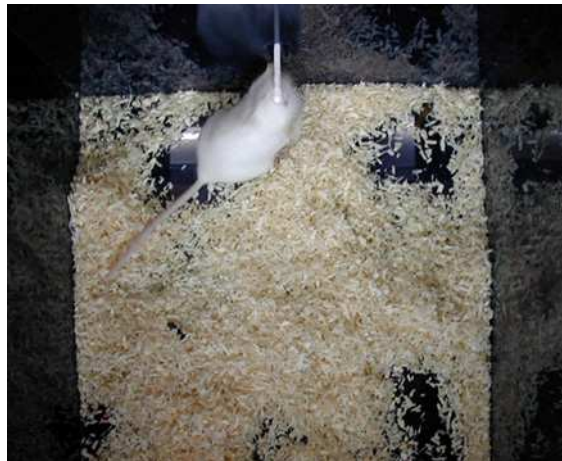


Figura 8. Caja utilizada para los experimentos de habituación-deshabituación.

La inyección del fármaco correspondiente se realizaba previamente al test. Después del tiempo de actuación correspondiente a cada droga, los animales se introducían en la caja, donde se les permitía habituarse durante cinco minutos. A continuación, se procedía a seis

presentaciones sucesivas de un minuto de duración cada una de bastoncillos impregnados en sustancias control (aceite mineral para el experimento en el que utilizamos geraniol y citralva como estímulos, o agua para el experimento en que utilizamos orina de macho). Tras estas presentaciones tenían lugar las seis presentaciones sucesivas de un minuto del bastoncillo impregnado en la sustancia olorosa correspondiente.

En la Tabla 5 mostramos los fármacos, dosis y número de animales empleados en estos experimentos.

	Experimentos farmacológicos de discriminación olfativa	Fármaco	Dosis (mg/kg)	n
1. Sistemas catecolaminérgicos	Experimento 1.B Efecto de la anfetamina	Salino		7
		Anfetamina	0.5	7
		Agonista indirecto de la dopamina	2	7
3. Serotonina y óxido nítrico	Experimento 3.C Efecto del L-NAME	Salino		11
		L-NAME Antagonista de la síntesis de NO	100	11
n total				43

Tabla 5. Recopilación de los fármacos, dosis y número de animales utilizados en los experimentos para descartar un efecto sensorial de las drogas.

3.4.4 Experimentos de preferencia por una solución azucarada frente a agua

Para estos experimentos, las hembras se mantenían en un régimen de privación ligera de líquidos (Czirr y Reid, 1986). El agua se retiraba de las jaulas a las 20:00 h, y los tests se realizaban a la mañana siguiente entre las 8:00 y las 13:00. Elegimos este régimen basándonos en experimentos piloto porque aseguraba una ingesta robusta de líquido.

Para controlar dicha ingesta, se utilizó una *caja de Skinner* que contenía dos botellas con medidores de lametones conectados a un

ordenador equipado con el software Packwin (Panlab, Barcelona). Este sistema permite contar el número de lametones efectuados por los animales en cada una de las botellas.

Durante los dos días previos al experimento, se sometió a los animales al régimen de privación de líquidos descrito y se permitió el acceso de los mismos durante quince minutos a la caja de test, en la que ambas botellas tenían agua, para que se habituaran a las condiciones del experimento. Los animales que no bebieron durante estas sesiones se descartaron. El día del test, los animales recibieron la inyección intraperitoneal del fármaco correspondiente y, tras el tiempo necesario para que el tratamiento actuara, se introdujeron en la caja de test con una de las botellas llena de agua y la otra con una solución de sacarosa al 5%. El número de lametones en cada una de ellas se registró durante quince minutos. Un resumen de los fármacos, dosis y número de animales utilizados en este tipo de experimentos se ofrece en la Tabla 6.

	Experimentos farmacológicos de consumo preferente de una solución de sacarosa frente a agua	Fármaco	Dosis (mg/kg)	n
2. Sistemas opioidérgicos	Experimento 2.A.1 Efecto de la naloxona	Salino		9
		Naloxona Antagonista general de opiáceos	1	7
			10	7
	Experimento 2.A.2 Efecto del fentanilo	Salino		9
		Fentanilo Agonista de los receptores μ -opiáceos	0.1	7
			0.5	7
		Descartadas		1
n total				47

Tabla 6. Recopilación de los fármacos, dosis y número de animales utilizados en los experimentos farmacológicos de preferencia por una solución azucarada.

3.5 MEDIDAS COMPORTAMENTALES

El comportamiento de los animales se midió con dos métodos: por un lado, en los experimentos que estudiaban los efectos de las drogas dopaminérgicas, una persona que no conocía el protocolo experimental midió mediante cronómetros el tiempo que los animales pasaban investigando los botes que contenían la viruta utilizada como fuente de estímulos. Se consideraba investigación al tiempo que los animales pasaban olfateando y escarbando en el recipiente que contenía los estímulos. En el resto de experimentos que exploraban las bases neuroquímicas de la atracción innata, con drogas que afectaban a la transmisión por noradrenalina, opiáceos, serotonina y óxido nítrico, así como en el experimento utilizando lesiones, se empleó un sistema automático de captación de imágenes (Figura 9) (SMART 2.0 y 2.5, Panlab) que permitía el registro del tiempo que pasaban los animales en un área circular de 10 cm de diámetro definida alrededor de los botes que contenían la viruta. Por ello, mientras en las gráficas del punto correspondiente a las drogas dopaminérgicas se especifica *tiempo de investigación*, en las de los puntos restantes se habla de *tiempo en las zonas*.

Adicionalmente, en los experimentos utilizando drogas monoaminérgicas se analizó el tiempo que los animales empleaban sólo escarbando, medido en todo caso mediante cronómetros, dado que se sabe que este comportamiento es afectado por este tipo de drogas (Gyertyan, 1995).

Para controlar los efectos de las drogas sobre el comportamiento global, y descartar que los posibles efectos sobre la preferencia se debieran a efectos inespecíficos sobre la locomoción o el comportamiento exploratorio se tomaron dos medidas. Para medir la locomoción, se dividió la caja en cuatro sectores sobre la pantalla y se contó el número de cruces entre ellos, manualmente o mediante el sistema SMART. Además, se analizó el tiempo total investigando (o pasado en ambas zonas) en el *control post-tratamiento*.

Para los experimentos de preferencia de lugar condicionada por feromonas de macho, la zona definida con el sistema SMART fue de 20 cm. La diferencia de tamaño entre las zonas de interés entre ambos tipos de experimento se justifica porque en los experimentos de atracción innata nos interesa fundamentalmente el tiempo que pasa el animal investigando los estímulos, cosa que hace mientras se encuentra cerca del bote, mientras que en los experimentos de preferencia condicionada de lugar nos interesa el tiempo que pasa cerca de los estímulos, sin tener en cuenta si está investigando o no.

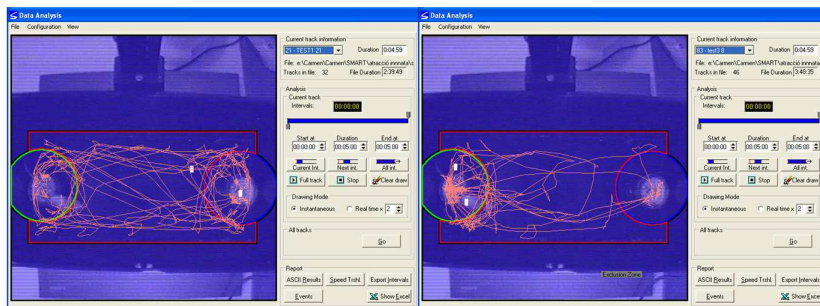


Figura 9. Capturas de la pantalla mostrada por el programa SMART 2.5, con dos recorridos típicos efectuados por los animales.

En la captura de la izquierda, se aprecia una exploración equilibrada de la caja y de ambos botes, como la que suele ocurrir en los tests de control. Por el contrario, en la pantalla de la derecha puede observarse cómo el animal prefería investigar la viruta contenida en el bote de la izquierda, como ocurre en animales normales en el test de preferencia por las feromonas de macho.

Para los tests de habituación-deshabituación, una persona que desconocía el protocolo y el tratamiento de los animales midió con un cronómetro el tiempo que los ratones estaban levantados sobre sus patas traseras oliendo la punta del bastoncillo, con el hocico a menos de un centímetro de la misma.

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos resultantes de los experimentos descritos se analizaron con el programa SPSS 14.0. En primer lugar, se comprobó siempre la normalidad de los datos mediante una prueba de Kolmogorov-Smirnov con la corrección de Lilliefors y la homocedasticidad con una prueba de Levene. Si los datos cumplían ambas condiciones, se aplicaron tests t de Student, ANOVAs univariantes o ANOVAs para medidas repetidas, seguidos de un análisis post-hoc de Dunnet o de comparaciones por parejas con la corrección de Bonferroni.

En el caso de no cumplirse la condición de normalidad, cosa que se especificará cuando corresponda, se aplicaron las pruebas no paramétricas de Wilcoxon para medidas relacionadas o de Kruskal-Wallis para medidas no relacionadas.

4. ESTUDIOS DESARROLLADOS

4.1 PAPEL DE LOS SISTEMAS CATECOLAMINÉRGICOS EN EL REFUERZO INDUCIDO POR FEROMONAS DE MACHO

4.1.1 Justificación

Este primer capítulo se dedica al estudio de la importancia de los sistemas catecolaminérgicos para el refuerzo inducido por feromonas, y de entre ellos, aquellos que utilizan las catecolaminas noradrenalina (o

norepinefrina) y dopamina (Figura 10). En primer lugar, expondremos la localización de las neuronas catecolaminérgicas y la distribución de los receptores para catecolaminas; a continuación comentaremos las diversas hipótesis que existen acerca de su papel específico en el refuerzo.

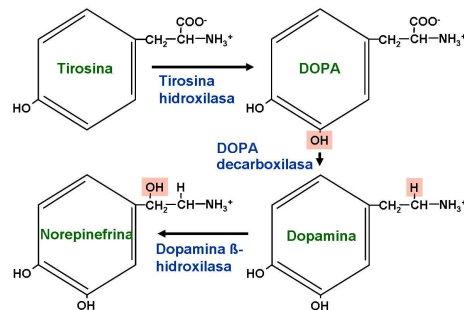


Figura 10. Ruta de síntesis de las catecolaminas.

A partir del aminoácido tirosina, la acción de diversas enzimas da lugar a la síntesis de la dopamina y a partir de ella de la norepinefrina. La ruta finaliza con la transformación de la norepinefrina en epinefrina por la acción de la enzima PNMT (no mostrado) (Adaptado de Purves *et al.*, 2001).

Sistemas dopaminérgicos

Los sistemas dopaminérgicos, tal como fueron descritos por primera vez por Dahlstrom y Fuxe (1964), se originan principalmente en ciertos núcleos del tegmento mesencefálico. Podemos distinguir dos vías dopaminérgicas principales (Figura 11): por un lado, la vía nigro-estriatal se origina en la *sustancia nigra* y proyecta al estriado dorsal, y resulta clave para la coordinación de los movimientos y las pautas motoras repetitivas, por lo que su pérdida en la enfermedad de Parkinson da lugar a los desastrosos efectos comportamentales bien conocidos por todos. Por otro lado, las neuronas que dan lugar a la vía meso-limbo-cortical tienen sus somas en el área ventral tegmental y envían sus proyecciones al

estriado ventral, septum, amígdala e hipocampo, así como a la corteza prefrontal, cingulada, perirrinal y entorrinal (Björklund y Lindvall, 1984).

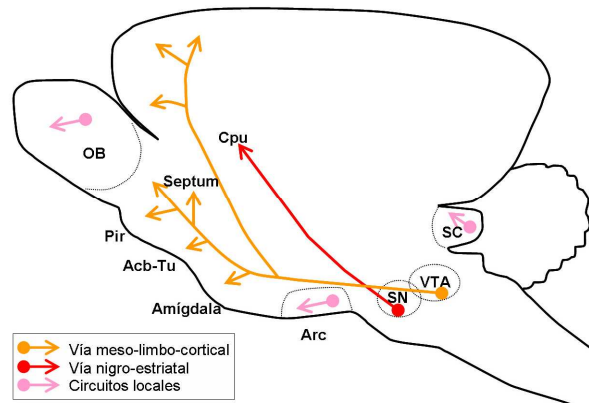


Figura 11. Esquema de los principales sistemas dopaminérgicos en el encéfalo del ratón. Abreviaturas: Acb: núcleo accumbens; Arc: núcleo arcuato; Cpu: caudatus putamen; OB; bulbo olfativo; Pir: corteza piriforme; SC: núcleo supraquiasmático; SN: sustancia nigra; Tu: tubérculo olfativo; VTA: área ventral tegmental. (Adaptado de Sheperd, 1994)

Además, existen numerosas neuronas dopaminérgicas en el hipotálamo, sobre todo a niveles tubero-infundibulares, en donde juegan un importante papel en el sistema neuroendocrino, sobre todo en la regulación de hormonas relacionadas con la reproducción, así como en los bulbos olfativos.

Los receptores para la dopamina son miembros de la superfamilia de proteínas asociadas a proteínas G, existiendo cinco receptores descritos, nombrados de D1 a D5. Sin embargo, se tiende a agrupar a los receptores dopaminérgicos en los de tipo D1 (receptores D1 y D5) y los de tipo D2 (D2, D3 y D4) (Sealfon y Olanow, 2000). El receptor D1 y el D2 muestran una amplia distribución que coincide con la de las neuronas dopaminérgicas, encontrándose los niveles más elevados en el estriado, la *sustancia nigra* y la capa glomerular del bulbo olfativo, y niveles relativamente elevados en la amígdala, sobre todo del tipo D1 en la

división basolateral (Wamsley *et al.*, 1989; Reader *et al.*, 1999). La distribución de los tipos restantes es algo más restringida; nos resulta de especial interés la del D3, cuya expresión se restringe al *shell* ventromedial del accumbens y sobre todo en los islotes de Calleja (Diaz *et al.*, 1995).

Por otro lado, la distribución y funciones de los diversos tipos de receptores es muchas veces complementaria; es bien conocido el caso de las vías eferentes directa e indirecta del estriado, originadas en neuronas que expresan receptores D1 y la D2 respectivamente (Gerfen *et al.*, 1990). Además, a nivel estriatal la activación del receptor D1 provoca un incremento de la actividad adenilato ciclasa, mientras que la activación de receptores D2 induce el efecto contrario (Nishi *et al.*, 1997). Esto puede explicar que, en ocasiones, los fármacos que afectan a cada tipo de receptores provoquen efectos opuestos sobre el comportamiento de los animales o la actividad neuronal (Eyny y Horvitz, 2003; Trantham-Davidson *et al.*, 2004).

Dopamina y refuerzo

Como vimos en la Introducción General, los experimentos de autoestimulación intracraneal primero y farmacológicos después focalizaron pronto la atención de los estudiosos del refuerzo sobre la dopamina, especialmente la vía meso-córtico-límbica, y su importancia para el desencadenamiento y mantenimiento de los comportamientos guiados por recompensa. Sin embargo, como también apuntábamos entonces, el espectacular número de estudios existentes hoy en día no ha desembocado en una teoría definitiva sobre el papel exacto de la dopamina en el refuerzo. Por lo tanto, para saber cual es el marco teórico

en el que nos movemos, a continuación ofrecemos un repaso somero a las hipótesis existentes.

La decana de las hipótesis acerca del papel de la dopamina en el refuerzo, como vimos en la Introducción General, fue la llamada *de la anhedonia* (Wise *et al.*, 1978; Wise y Rompré, 1989). Como su nombre indica, los autores citados consideraban que la dopamina debía ser el agente causal de la sensación de placer asociada al consumo de una recompensa, al interpretar que la reducción en la tasa de respuesta instrumental de los animales bajo tratamiento con neurolépticos para conseguir una recompensa era el reflejo de la pérdida del valor hedónico de la misma para el animal. Sin embargo, esta hipótesis era demasiado simplista en su interpretación, y con el tiempo se ha ido abandonando. La prueba más reciente en contra vino de la mano de unos ratones mutantes que carecen de tirosina hidroxilasa (ver Figura 10), y por lo tanto son incapaces de producir dopamina: estos ratones prefieren de manera robusta consumir una solución de sacarina frente a agua (Cannon y Palmiter, 2003). Dado que ambos tipos de bebida proporcionan la misma aportación calórica, la única explicación razonable al mayor consumo de la solución dulce es que los animales la prefieren por el placer que provoca su ingesta. Además, uno de los puntos débiles de la hipótesis de la *anhedonia*, que a la vez constituye el principal problema al que nos enfrentamos cuando nos proponemos estudiar los mecanismos del refuerzo, es que normalmente se utilizan paradigmas que implican algún tipo de aprendizaje, lo cual añade variables no deseadas impidiéndonos estudiar la componente hedónica principal del estímulo que estamos utilizando. Como señalamos en la

Introducción General, precisamente la ventaja de nuestro modelo radica en la posibilidad de estudiar el *refuerzo primario*, ya que las hembras de ratón presentan una atracción innata por feromonas de macho.

En línea con esta observación, Berridge y Robinson (1998) inciden sobre la necesidad de contraponer el placer que proporciona una recompensa con la apetencia que induce, cosa que estos autores resumen en el aforismo *liking vs. wanting*. Según ellos, los sistemas dopaminérgicos no median ni la sensación hedónica proporcionada por la recompensa, es decir, el *liking* (como proponía la *hipótesis de la anhedonia*) ni los procesos de aprendizaje asociados a la misma (como propone la *hipótesis del refuerzo*, ver más abajo), sino que son imprescindibles para modular el valor motivacional –el *wanting*– que posee cada recompensa. Es decir, la dopamina no sería la responsable de que nos guste un determinado estímulo, sino de que lo queramos, de que estemos motivados para conseguirlo.

En una vuelta de tuerca adicional sobre la hipótesis anterior, Salamone y Correa, (2002), proponen dividir la componente *wanting* en apetencia por consumir la recompensa y activación para obtenerla –o disponibilidad del animal por trabajar por esa recompensa–, y sugieren que la dopamina es necesaria sólo para este último proceso.

Un tercer grupo de hipótesis considera que la dopamina es necesaria para la asociación de la recompensa con estímulos predictores de la misma. Así, la *hipótesis del refuerzo* propone que la dopamina es necesaria para el establecimiento y posterior fortalecimiento de las asociaciones estímulo-respuesta que tienen lugar cuando se presenta una recompensa al sujeto experimental, basándose en observaciones sobre la

incapacidad de los animales de aprender a presionar una palanca para recibir comida bajo tratamientos con neurolépticos (Wise y Schwartz, 1981).

Por último, Schultz (2002) ofrece un análisis desde un punto de vista algo distinto. Este autor investiga con mucho detalle las respuestas tónicas y fásicas de las neuronas tegmentales dopaminérgicas frente a la recompensa primaria y a los estímulos condicionados a la misma a medida que avanza el aprendizaje. En las primeras experiencias del animal con una recompensa, las neuronas dopaminérgicas se activan ante su presencia (Figura 12A), pero a medida que la recompensa se va haciendo predecible por los estímulos exteriores asociados a la misma, el disparo de las neuronas tegmentales se transfiere desde la recompensa hasta el estímulo predictor, hasta que la liberación de dopamina se produce únicamente tras la aparición de éste (Figura 12B, C). Por el contrario, si tras el estímulo predictor la recompensa no llega cuando debiera, el disparo de las neuronas tegmentales muestra una clara inhibición (Figura 12D).

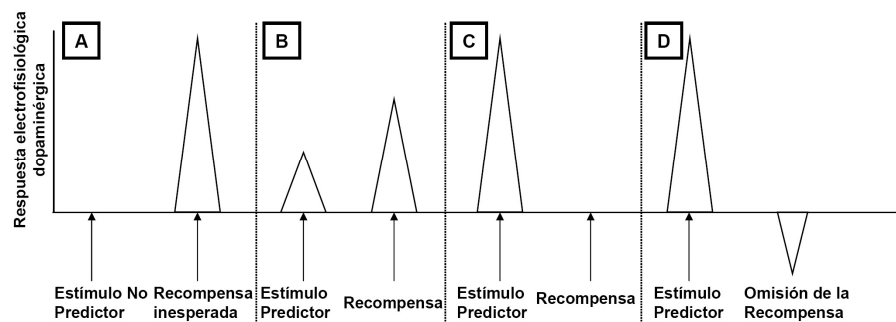


Figura 12. Hipótesis de la predicción de errores de Schultz. Esquema de las respuestas electrofisiológicas de neuronas individuales a estímulos relacionados con el refuerzo. Adaptado de Schultz, 2007. Para una explicación detallada, ver texto.

Con estos datos, Schultz concluye que la actividad de las neuronas dopaminérgicas tegmentales no es necesaria ni para la sensación hedónica ni para la motivación, sino que más bien actúa como una señal *predictora* de la aparición de la recompensa.

En este capítulo consideraremos si el papel del sistema dopaminérgico en los comportamientos guiados por feromonas encaja con alguna de las visiones expuestas. Cuando se iniciaron los experimentos pertinentes teníamos datos que apuntaban en direcciones opuestas. Sabíamos, por ejemplo, que cuando se expone a ratas macho a olor de hembras en estro se produce una liberación de dopamina en el núcleo accumbens (Mitchell y Gratton, 1991, 1992), lo cual podría ser indicativo de un papel de la dopamina en la detección de estímulos olfativos/vomeronasales sexualmente relevantes. Sin embargo, los primeros resultados que proporcionó nuestro laboratorio a este respecto habían sido negativos: lesiones específicas con 6-OH-dopamina de las neuronas dopaminérgicas del área ventral tegmental no afectaron a la atracción innata de las hembras de ratón por feromonas de macho, a pesar de ser efectivas en el bloqueo del consumo preferente de una solución azucarada (Martínez-Hernández *et al.*, 2006).

Pese a esta evidencia, quisimos continuar explorando los posibles efectos de la dopamina, por tres razones: validar mediante otra técnica el resultado precedente, explorar los posibles efectos de un exceso, en lugar de un defecto, de dopamina, e investigar si la dopamina pudiera estar implicada en otros aspectos del refuerzo inducido por feromonas, tales como el aprendizaje.

Sistemas noradrenérgicos

El mayor conjunto de neuronas productoras de noradrenalina se encuentra en el *locus coeruleus*, cuyos axones inervan prácticamente todo el telencéfalo, incluyendo el tubérculo olfativo, septum, bulbo olfativo, hipocampo y neocórtex en general, además del tálamo. Por otro lado, las neuronas noradrenérgicas del área lateral tegmental inervan fundamentalmente el hipotálamo (Moore y Card, 1984) (Figura 13).

Se han descrito tres tipos de receptores noradrenérgicos, cada uno de los cuales presenta distintos subtipos. La noradrenalina puede actuar activando o inhibiendo la actividad neuronal dependiendo del tipo de receptor sobre el que actúe.

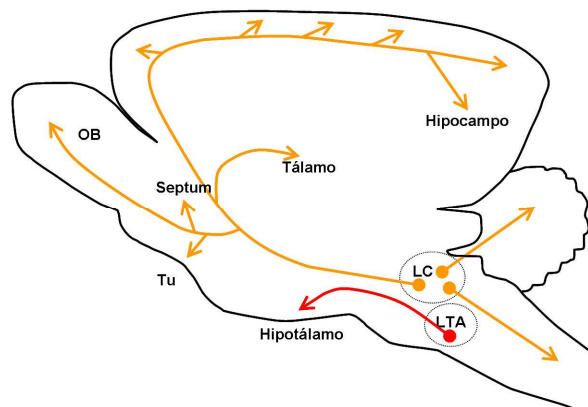


Figura 13. Esquema de los principales sistemas noradrenérgicos en el encéfalo del ratón. Abreviaturas: LC: locus coeruleus; LTA: área lateral tegmental; OB: bulbo olfativo; Tu: tubérculo olfativo. (Adaptado de Sheperd, 1994)

Así pues, los receptores del tipo β (β_1 , β_2 y β_3 , siendo el β_1 el más abundante en el telencéfalo, Rainbow *et al.*, 1984) incrementan la actividad de la adenilato ciclasa mientras que los del tipo α_2 (α_2A , α_2B , α_2C) la inhiben. Por otro lado, los del tipo los α_1 (α_1A , α_1B , α_1D) se

encuentran asociados a la fosfolipasa C (revisión en Ramos y Arnsten, 2007).

Respecto a su distribución, encontramos los receptores α_1 y α_2 sobre todo en el bulbo olfativo, la corteza piriforme anterior, el septum lateral y tálamo e hipotálamo, además de en el hipocampo (Young y Kuhar, 1980). En cuanto a los receptores β , podemos encontrar niveles elevados en el hipotálamo, el estriado (incluyendo *caudatus-putamen*, tubérculo olfativo e islotes de Calleja) la corteza cingulada, la amígdala basolateral y el hipocampo. En general, los receptores de tipo β_1 son más abundantes en el prosencéfalo que los β_2 , que predominan en el cerebelo (Rainbow *et al.*, 1984).

Noradrenalina, refuerzo y sexo

Como vimos en la Introducción General, la noradrenalina fue el neurotransmisor que se consideró por primera vez como integrante de un putativo sistema del refuerzo en base a los experimentos de autoestimulación intracerebral, ya que se producían resultados positivos cuando los electrodos se colocaban en el tracto dorsal tegmental noradrenérgico, así como en el *locus coeruleus* (Poschel, 1963; revisión en Wise, 1978). Sin embargo, pronto los resultados negativos plantearon alternativas, como por ejemplo la participación del sistema dopaminérgico en el fenómeno (Koob *et al.*, 1978; Corbett y Wise, 1979).

La noradrenalina, no obstante, juega un papel muy importante en el comportamiento sexual y en algunos de los efectos neuroendocrinos mediados por feromonas. Así, se ha comprobado la importancia del receptor α_2 en la motivación sexual tanto en hembras de rata (González *et al.*, 1996) como en machos (Viitamaa *et al.*, 2006). De la misma manera,

el incremento de la transmisión noradrenérgica, a través de los receptores α , en el bulbo olfativo accesorio durante la cópula es fundamental para el establecimiento de la memoria olfativa que da lugar al efecto Bruce (Kaba y Keverne, 1988, Brennan *et al.*, 1995; Okere *et al.*, 1996). La noradrenalina es asimismo fundamental para el desarrollo de un comportamiento maternal adecuado, que en roedores es dependiente de manera directa del reconocimiento olfativo de las crías (Thomas y Palmiter, 1997)

4.1.2 Grupos experimentales

Con el objetivo de explorar la implicación del sistema dopaminérgico en la atracción innata por feromonas, sometimos a las hembras químicamente vírgenes a un *test de preferencia por feromonas de macho* bajo tratamiento con diversos antagonistas y agonistas, tanto específicos como indirectos, de la dopamina (Tabla 7). El tiempo entre la administración de las diversas drogas y el primer test comportamental fue de 20 minutos. Dado que estas drogas afectan a la olfacción en roedores (Doty y Fergusson-Segall, 1987), se realizaron experimentos adicionales para comprobar la función olfativa de los animales tratados con anfetamina (20 minutos antes del test comportamental) (Tabla 8). Además, para comprobar si la activación del sistema dopaminérgico era necesaria para la adquisición de una preferencia de lugar condicionada por feromonas de macho, administramos los fármacos antagonistas de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 20 minutos antes de cada una de las sesiones de entrenamiento necesarias para el establecimiento de este tipo de condicionamiento (ver Material y Métodos, Tabla 9)

Experimento 1.A: Efecto de fármacos dopaminérgicos sobre la atracción innata por feromonas de macho	Fármaco	Dosis (mg/kg)	n
Experimento 1.A.1 Efecto de antagonistas específicos de los receptores D1 y D2 de la dopamina	Salino		12
	SCH 23390	0.02	9
	Antagonista D1	0.05	8
	Sulpiride Antagonista D2	20	10
Experimento 1.A.2 Efecto de la anfetamina	Salino		12
	Anfetamina	0.5	10
	Agonista indirecto de la dopamina	2	8
Experimento 1.A.3 Efecto de los agonistas específicos de los receptores D1 y D2 de la dopamina	Salino		11
	SKF 38393	10	8
	Agonista D1	20	7
	Quinpirol	0.2	7
	Agonista D2	1	8

Tabla 7. Grupos experimentales utilizados para explorar el efecto de las drogas dopaminérgicas sobre la atracción innata de las hembras de ratón por feromonas de macho.

	Fármaco	Dosis (mg/kg)	n
Experimento 1.B: Efecto de la anfetamina sobre la función olfativa de las hembras de ratón	Salino		7
	Anfetamina	0.5	7
	Agonista indirecto de la dopamina	2	7

Tabla 8. Grupos experimentales utilizados para explorar el efecto de la anfetamina sobre la capacidad de los sujetos experimentales de detectar olores neutros.

El tiempo entre la administración de la droga y el test comportamental fue de 20 minutos.

	Fármaco	Dosis (mg/kg)	n
Experimento 1.C: Efecto de los antagonistas de la dopamina sobre la adquisición de preferencia de lugar condicionada por feromonas de macho	Salino		10
	SCH 23390	0.05	10
	Antagonista D1		
	Sulpiride Antagonista D2	20	10

Tabla 9. Grupos experimentales utilizados para explorar el efecto del bloqueo farmacológico de los receptores D1 y D2 durante la adquisición de una preferencia de lugar condicionada por feromonas de macho.

Estos grupos experimentales se subdividían en dos subgrupos, cada uno de los cuales tenía la zona reforzada en uno de los lados de la caja, es decir, la mitad de los animales asociaron la recompensa con la zona izquierda y la otra mitad con la zona derecha.

Experimento 1.D: Efecto de fármacos con actividad noradrenérgica sobre la atracción innata por feromonas de macho	Fármaco	Dosis (mg/kg)	n
Experimento 1.D.1 Efecto de la desipramina	Salino		10
	Desipramina Agonista indirecto de la noradrenalina	10	11
		20	11
Experimento 1.D.2 Efecto de la yohimbina	Salino		12
	Yohimbina Antagonista $\alpha 2$	1	12

Tabla 10. Grupos experimentales utilizados para explorar el efecto de fármacos con actividad noradrenérgica sobre la atracción innata de las hembras de ratón por feromonas de macho.

Finalmente, para estudiar si la noradrenalina es necesaria para la atracción innata por feromonas de macho elegimos en primer lugar un fármaco inhibidor de la recaptación de la noradrenalina, la desipramina. Dado que este fármaco tiene características similares a la anfetamina, pero sin actividad dopaminérgica, nos permitía comparar los resultados de ambas drogas, afinando el análisis. A continuación, debido a la importancia de los receptores $\alpha 2$ en los estudios revisados, analizamos los efectos de un antagonista de este receptor, la yohimbina (Tabla 10), que por sus características resulta en realidad un agonista indirecto de la noradrenalina, ya que los $\alpha 2$ son receptores presinápticos que inhiben la liberación de noradrenalina (Langer, 1980). El tiempo entre la administración de la droga y el primer test comportamental fue de 30 minutos.

4.1.3 Resultados

Experimento 1.A: Efecto de fármacos dopaminérgicos sobre la atracción innata por feromonas de macho

Experimento 1.A.1: Efecto de antagonistas específicos de los receptores D1 y D2 de la dopamina

En primer lugar, se analizaron aquellos comportamientos que podían verse afectados por este tipo de drogas, interfiriendo por tanto en el test de preferencia. Así, comenzamos analizando si los animales no mostraban alteraciones en la locomoción. Para ello, se sumó el número de sectores cruzados por los sujetos en el *control post-tratamiento* y el *test de preferencia por feromonas de macho* (ver Material y Métodos), es decir, durante los tests en los que el animal se encontraba bajo el efecto de la droga. Este dato se analizó con un ANOVA univariante con el factor entre-sujetos GRUPO, seguido de un análisis post-hoc de Dunnet con el grupo Salino como categoría de control. Como muestra la Figura 14A, la dosis más alta de SCH (0.05 mg/kg), disminuyó notablemente el número de cruces (ANOVA, $F_{3, 35}=4.253$, $p=0.012$, post-hoc de Dunnet, Salino vs SCH 0.05 mg/kg, $p=0.007$), mientras que el resto de los tratamientos no afectaron a la locomoción.

En segundo lugar, se analizó como medida de la capacidad investigadora de los animales la suma del tiempo empleado investigando ambos botes con viruta de hembra en el *test de control post-tratamiento*, también con un ANOVA univariante entre grupos. Aunque el ANOVA resultó significativo, el post-hoc de Dunnet reveló que las drogas no

afectaron significativamente al tiempo empleado por las hembras experimentales a la investigación de los estímulos al compararlas con el grupo Salino ($F_{3, 35}=3.013$, $p=0.043$; post-hoc de Dunnet: SCH 0.02 mg/kg *vs.* Salino, $p=0.318$; SCH 0.05 mg/kg *vs.* Salino, $p=0.328$; Sulp *vs.* Salino, $p=0.557$) (Figura 14B).

El análisis del efecto de los antagonistas sobre la atracción innata de las hembras de ratón por feromonas de macho demostró que el bloqueo de los receptores D1 y D2 no afecta a este comportamiento. Se utilizó un ANOVA de medidas repetidas para analizar el tiempo empleado por la hembras en investigar cada tipo de viruta, con los factores intra-sujetos TEST (*control post-tratamiento* y *test de preferencia por feromonas de macho*) y LADO (ambos lados contenían feromonas de hembra en el *control post-tratamiento*, mientras que en el *test de preferencia por feromonas de macho* uno contenía viruta de hembra y el otro viruta de macho) y GRUPO (Salino, SCH 0.02 mg/kg, SCH 0.05 mg/kg, Sulp 20 mg/kg) como factor entre-sujetos. Este análisis reveló que no existía una interacción significativa entre los factores TEST x LADO x GRUPO ($F_{3, 35}=0.938$, $p=0.433$) ni TEST x GRUPO ($F_{3, 35}=1.809$, $p=0.164$), pero sí entre los factores TEST x LADO ($F_{3, 35}=66.757$, $p<0.001$) y LADO x GRUPO ($F_{3, 35}=3.479$, $p=0.026$). Además, los factores TEST ($F_{1, 35}=45.274$, $p<0.001$), LADO ($F_{1, 35}=105.147$, $p<0.001$) y GRUPO ($F_{1, 35}=4.260$, $p=0.011$) contribuyeron de manera significativa a las diferencias que mostraban los datos.

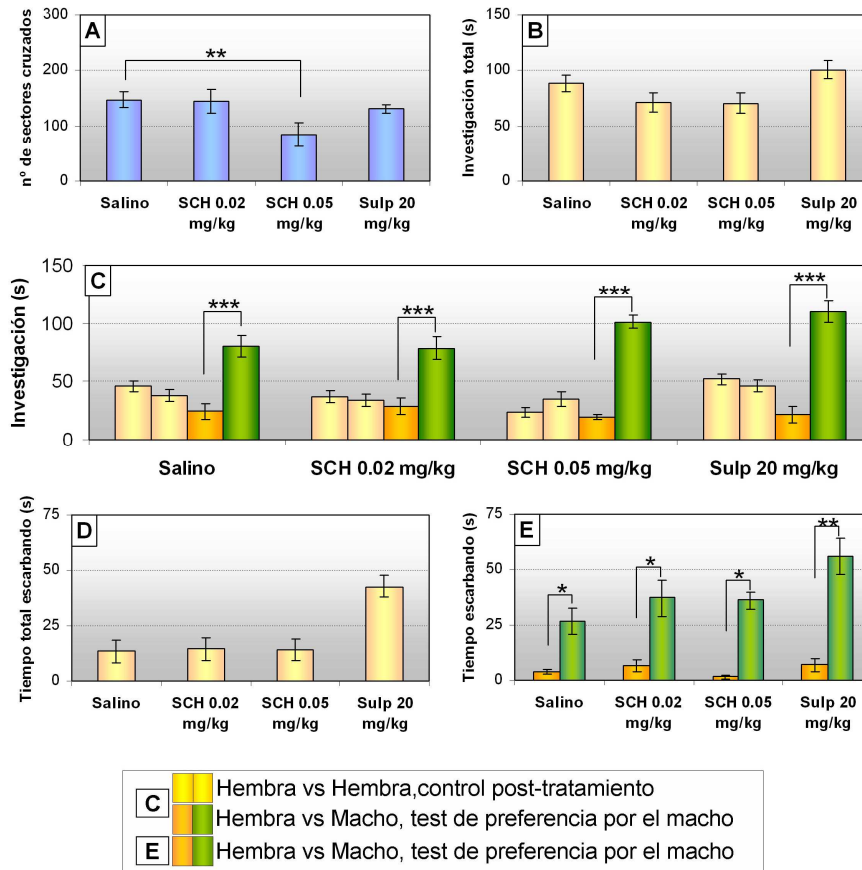


Figura 14. Efecto de los antagonistas dopaminérgicos sobre la atracción innata por feromonas de macho y el comportamiento de escarbar.

A. Locomoción; suma de los sectores cruzados en el control post-tratamiento y el test de preferencia por las feromonas de macho. B. Investigación total; suma de la investigación de ambos recipientes en el control post-tratamiento. C. Investigación preferente; tiempo investigando cada recipiente en el control post-tratamiento y el test de preferencia por feromonas de macho. D. Tiempo total escarbando; suma del tiempo escarbando en ambos recipientes en el control post-tratamiento. E. Tiempo escarbando en cada recipiente en el test de preferencia por feromonas de macho. *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$

Las comparaciones por parejas entre LADOS en cada TEST revelaron que las hembras pasaban más tiempo investigando la viruta de macho en el *test de preferencia por feromonas de macho* ($p < 0.001$). Además, la falta de interacción de tercer orden entre los factores TEST x LADO x

GRUPO indica que todos los grupos mostraban una preferencia similar por las feromonas contenidas en la viruta usada por machos (Figura 14C). Por último, las comparaciones por parejas entre grupos mostraron que el efecto significativo de este factor se debía a diferencias globales entre los grupos SCH 0.02 mg/kg y Sulp ($p=0.014$), mientras que ninguno de los grupos tratados dio lugar a diferencias respecto del grupo de control.

En cuanto al comportamiento de escarbar, se utilizó un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis, comparando la suma del tiempo escarbando en ambos botes en el *control post-tratamiento*. Este análisis reveló diferencias significativas entre los grupos ($p=0.016$), que como puede observarse muy claramente en la figura Figura 14D, se debieron a un gran incremento de esta actividad provocada por el antagonista de los receptores D2. Para finalizar, el análisis de Wilcoxon comparando el tiempo que dedicaban las hembras a escarbar en la viruta de hembras con el que escarbaban en la de machos (Figura 14E), reveló que este comportamiento también es preferencial (Salino, $p=0.011$; SCH 0.02 mg/kg, $p=0.033$, SCH 0.05 mg/kg, $p=0.011$; Sulp, $p=0.007$). Asimismo, el tiempo dedicado por las hembras a escarbar la viruta de macho presentó una tendencia marginalmente significativa a ser aumentado por los tratamientos, tendencia debida al Sulp (Figura 14E) (Análisis de Kruskal-Wallis, $p=0.069$).

Experimento 1.A.2: Efecto de la anfetamina

El ANOVA de la actividad locomotora indicó un efecto global de los tratamientos ($F_{2,25}=7.647$, $p=0.003$; Figura 15A). El análisis post-hoc de Dunnett reveló que sólo la dosis alta ($p=0.003$), pero no la baja

($p=0.987$), incrementó la movilidad de los animales respecto a los del grupo Salino.

Sin embargo, el comportamiento exploratorio no se vio afectado por la anfetamina (Figura 15B), como demostró el ANOVA comparando la suma del tiempo explorando los botes que contenían viruta de hembra en el *control post-tratamiento* ($F_{2,25}=0.189$, $p=0.189$).

Muy al contrario de lo que sucedió con los antagonistas, el tratamiento con el agonista indirecto de la dopamina eliminó la preferencia de las hembras por las feromonas de macho. El ANOVA de medidas repetidas con el que analizamos el tiempo que empleaban las hembras en la investigación de cada estímulo reveló una interacción significativa de los factores TEST x LADO x GRUPO ($F_{2,25}=3.761$, $p=0.037$) y TEST x LADO ($F_{2,25}=14.578$, $p=0.001$), así como efecto significativo de los factores TEST ($F_{1,25}=9.301$, $p=0.005$), LADO ($F_{1,25}=2.049$, $p=0.002$) y GRUPO ($F_{1,25}=3.439$, $p=0.048$). Por el contrario, las interacciones TEST x LADO ($F_{2,25}=1.651$, $p=0.212$) y LADO x GRUPO ($F_{2,25}=2.049$, $p=0.150$) no fueron significativas. Las comparaciones por parejas entre LADOS en cada TEST y GRUPO demostraron que únicamente los animales del grupo Salino mostraban una preferencia consistente por la exploración de las feromonas de macho ($p<0.001$). El tiempo investigando ambos botes fue similar en el *control post-tratamiento* (donde ambos botes contenían feromonas de hembra) en todos los grupos, así como en el *test de preferencia por feromonas de macho* en los animales tratados con anfetamina ($p>0.1$ en todos los casos) (Figura 15C). Por tanto, la anfetamina eliminó la preferencia innata de las hembras por las señales químicas derivadas de machos.

El comportamiento de escarbar también resultó claramente afectado por los tratamientos, hasta el punto de que ninguno de los animales tratados la dosis alta escarbó bajo los efectos de la droga (Figura 15D), cosa que resultó además en una falta de normalidad, por lo que se aplicaron análisis no paramétricos.

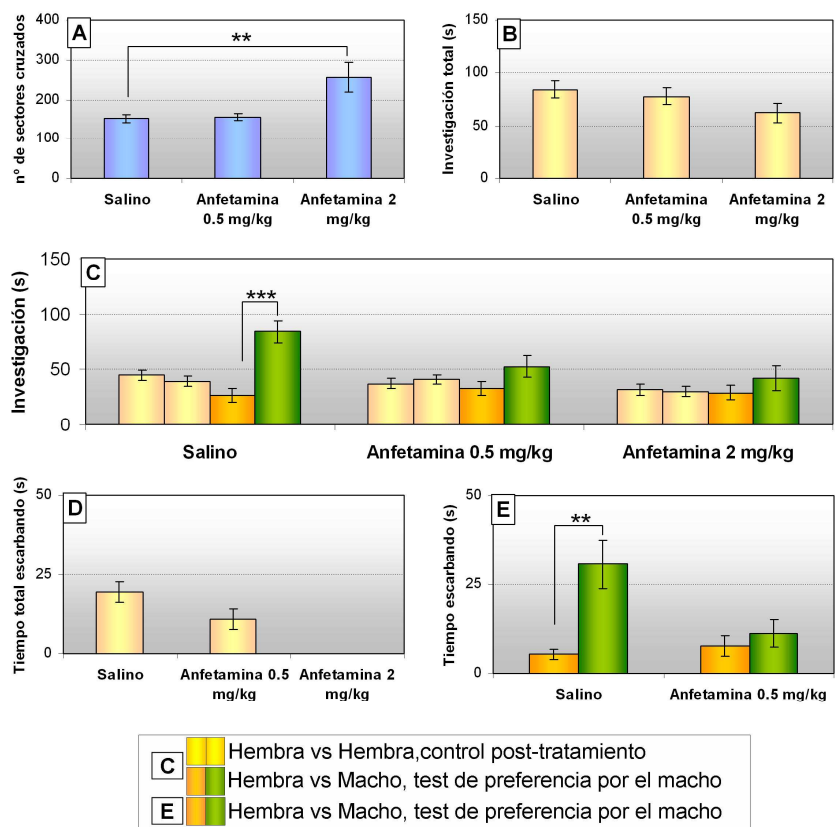


Figura 15. Efecto de la anfetamina sobre la atracción innata por feromonas de macho y el comportamiento de escarbar.

A. Locomoción; suma de los sectores cruzados en el control post-tratamiento y el test de preferencia por las feromonas de macho. B. Investigación total; suma de la investigación de ambos recipientes en el control post-tratamiento. C. Investigación preferente; tiempo investigando cada recipiente en el control post-tratamiento y el test de preferencia por feromonas de macho. D. Tiempo total escarbando; suma del tiempo escarbando en ambos recipientes en el control post-tratamiento. E. Tiempo escarbando en cada recipiente en el test de preferencia por feromonas de macho. *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$

Así pues, un test de Kruskal-Wallis reveló diferencias significativas entre los grupos en el *control post-tratamiento* ($p < 0.001$). Finalmente, el test de Wilcoxon comparando el tiempo escarbando en la viruta de hembra frente a la de macho demostró que sólo los animales tratados con Salino preferían escarbar la viruta de machos (Salino, $p = 0.009$; anfetamina 0.5 mg/kg, $p = 0.514$; anfetamina 2 mg/kg, $p = 1$; Figura 15E). El test de Kruskal-Wallis reveló además diferencias significativas en el tiempo escarbando la viruta de macho entre los grupos ($p = 0.001$).

Como conclusión, la dosis alta de anfetamina, en nuestro paradigma, incrementó la locomoción y eliminó el comportamiento de escarbar. Aunque ninguna de las dosis afectó globalmente al comportamiento exploratorio general de las hembras, ambas suprimieron su preferencia incondicionada por las feromonas de macho.

Experimento 1.A.3: Efecto de los agonistas específicos de los receptores D1 y D2 de la dopamina

Los tratamientos con los fármacos empleados en este experimento afectaron de manera dramática a la locomoción. El ANOVA y el subsiguiente análisis post-hoc de Dunnett reveló diferencias significativas entre los grupos tratados con los agonistas y el Salino (ANOVA: $F_{4, 36} = 27.970$, $p < 0.001$, Salino *vs* todos los grupos tratados con fármacos, $p < 0.001$) (Figura 16A). De hecho, las hembras tratadas con SKF 10 mg/kg y Quin 1 mg/kg, además del dramático descenso en el número de sectores cruzados mostraban temblores, y una afectación patente de su comportamiento en general. Por tanto, los datos procedentes de los grupos tratados con estas dosis fueron descartados

para los análisis estadísticos posteriores, aunque ofrecemos los valores numéricos de los mismos junto con los del grupo salino para posibilitar la comparación (Tabla 11).

GRUPO EXPERIMENTAL	n° de sectores cruzados M±E.t.	Tiempo total investigando la viruta de hembra en el control post-tratamiento (s) M±E.t.	Tiempo investigando la viruta de hembra en el test de preferencia por el macho (s) M±E.t.	Tiempo investigando la viruta de macho en el test de preferencia por el macho (s) M±E.t.
Salino	155.36±6.76	94.00±4.68	22.81±2.58	95.63±8.19
SKF 10 mg/kg	36.38±5.70	33.75±8.42	15.88±4.15	21.50±5.91
Quin 1 mg/kg	39.00±4.04	60.00±10.01	20.88±6.52	24.88±3.42

Tabla 11. Parámetros comportamentales medidos en los grupos tratados con las dosis baja de SKF y alta de Quin.

Notar que ninguno de los animales presentó el comportamiento de escarbar en ninguno de los dos tests.

Además del efecto sobre la locomoción, el tratamiento con SKF redujo también la investigación total en el *control post-tratamiento* (ANOVA: $F_{2, 22}=9.540$, $p=0.001$; post-hoc Dunnet, SKF 20 mg/kg vs SAL, $p<0.001$; QUIN 0.2 mg/kg vs SAL, $p=0.111$) (Figura 16B).

El análisis del efecto de los agonistas dopaminérgicos sobre la preferencia innata por feromonas de macho reveló que el agonista del receptor D1 eliminaba la preferencia, no así el agonista de D2 (Figura 16C). En el ANOVA de medidas repetidas resultaron significativas las interacciones entre los factores TEST x LADO x GRUPO ($F_{2, 22}=4.486$, $p=0.023$), TEST x LADO ($F_{2, 22}=27.704$, $p<0.001$) y LADO x GRUPO ($F_{2, 22}=7.475$, $p=0.003$), así como los factores LADO ($F_{1, 22}=51.755$, $p<0.001$) y GRUPO ($F_{1, 22}=16.191$, $p<0.001$). Además, la interacción TEST x GRUPO ($F_{2, 22}=2.783$, $p=0.084$) y el factor TEST ($F_{1, 22}=3.679$,

$p=0.068$) contribuyeron marginalmente a las diferencias observadas en los datos. Las comparaciones por parejas entre los LADOS en cada TEST y GRUPO revelaron que la preferencia por las feromonas de macho se expresaba únicamente en los grupos Salino y Quin ($p<0.001$), mientras que las hembras tratadas con SKF no mostraban una diferencia significativa en el tiempo empleado en investigar la viruta de hembra y la de macho ($p=0.283$). Los resultados quedan validados por la falta de preferencia de los animales por cualquiera de los dos lados en el *control post-tratamiento* ($p>0.5$ en todos los casos).

Como en el caso de la anfetamina, también los agonistas directos disminuyeron el tiempo dedicado a escarbar (Kruskal-Wallis, $p=0.003$) (Figura 16D). Por último, el análisis del tiempo escarbando ambas virutas durante el *test de preferencia por feromonas de macho* reveló que ambos agonistas de la dopamina suprimían el escarbado preferencial de la viruta de macho (Wilcoxon: SKF 20 mg/kg, $p=0.655$; Quin 0.2 mg/kg, $p=0.180$) que sí mostraban los animales del grupo control (Salino, $p=0.003$) (Figura 16E). De hecho, el test de Kruskal-Wallis demostró diferencias significativas en el tiempo dedicado a escarbar la viruta de macho entre los grupos ($p=0.001$).

Por tanto, mientras los dos agonistas redujeron tanto la locomoción como el tiempo escarbando, así como el escarbado preferente de la viruta de macho, sus efectos sobre la preferencia por señales químicas de macho fueron diferentes, ya que sólo el agonista de D1 eliminó esta preferencia.

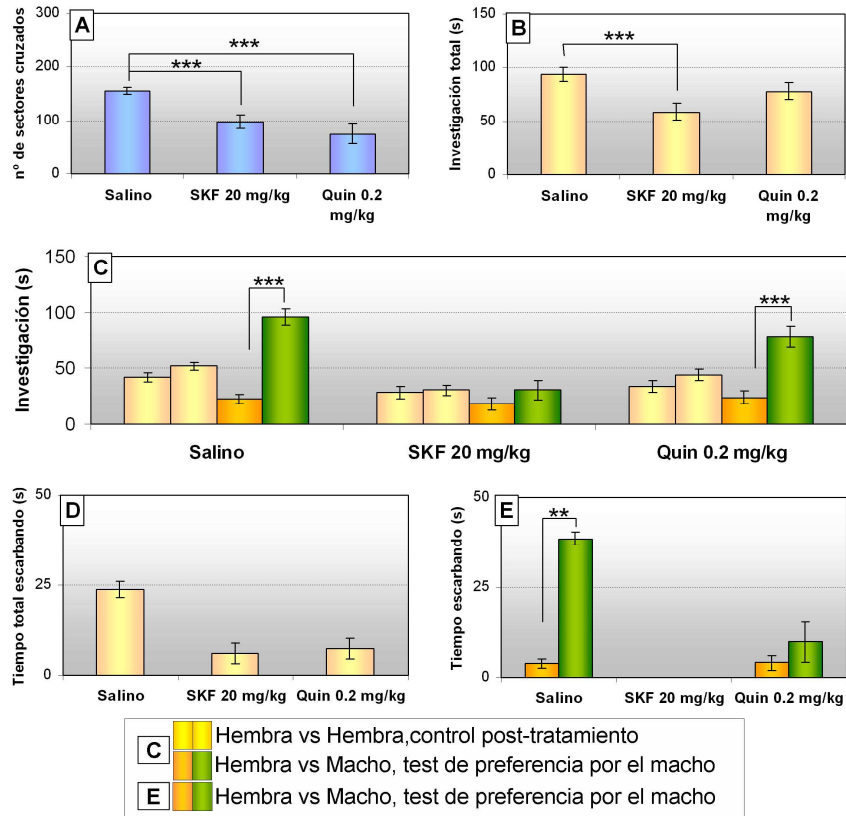


Figura 16. Efecto de los agonistas específicos de la dopamina sobre la atracción innata por feromonas de macho y el comportamiento de escarbar.

A. Locomoción; suma de los sectores cruzados en el control post-tratamiento y el test de preferencia por las feromonas de macho. B. Investigación total; suma de la investigación de ambos recipientes en el control post-tratamiento. C. Investigación preferente; tiempo investigando cada recipiente en el control post-tratamiento y el test de preferencia por feromonas de macho. D. Tiempo total escarbando; suma del tiempo escarbando en ambos recipientes en el control post-tratamiento. E. Tiempo escarbando en cada recipiente en el test de preferencia por feromonas de macho. *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$

Experimento 1.B: Efecto de la anfetamina sobre la función olfativa de las hembras de ratón

Como ya comentamos, la anfetamina puede afectar a la olfacción en roedores (Doty y Ferguson-Segall, 1987). Aunque cuando se realizaron estos experimentos ya sospechábamos que las feromonas

reforzantes para las hembras eran detectadas por el órgano vomeronasal, puesto que son no volátiles (Moncho-Bogani *et al.*, 2002), la demostración definitiva de este punto llegó después (Martínez-Ricós *et al.*, *in press*). Así pues, se hacía necesario saber si la olfacción en general se veía afectada por el tratamiento con anfetamina, dado que la pérdida de preferencia por las feromonas de macho podía estar provocada por un déficit sensorial que impidiera al animal detectar las mismas. Para ello utilizamos un protocolo estándar de función olfativa, la *habitación-deshabitación* (ver Material y Métodos).

Aplicando un test de Wilcoxon para comparar el tiempo de exploración de la última presentación del bastoncillo impregnado en vehículo con el tiempo investigando la primera presentación del olor A comprobamos que tanto las hembras tratadas con Salino ($p=0.027$) como las hembras tratadas con anfetamina 0.5 mg/kg ($p=0.027$) fueron capaces de discriminar olfativamente la primera sustancia. Por el contrario, los sujetos tratados con Salino no mostraron una exploración incrementada con la presentación del olor B ($p=0.465$), fenómeno que sí se observó en las hembras tratadas con la dosis baja de anfetamina ($p=0.027$). Por último, los animales tratados con la dosis alta de anfetamina parecían funcionalmente anósmicos, al no discriminar, comportamentalmente, ninguno de los dos olores (vehículo vs A, $p=0.109$; A vs B $p=0.180$) (Figura 17).

Estos resultados sugieren que la sensibilidad olfativa de los ratones frente a olores neutros resultó incrementada por la dosis baja, ya que los animales consiguieron discriminar el segundo olor, y disminuida por la dosis alta de anfetamina, que no discriminaron. Dado que ambas

dosis afectaron en la misma medida a la preferencia por feromonas, eliminándola, concluimos que esta eliminación de la apetencia por feromonas de macho no estaba relacionada con una pérdida sensorial.

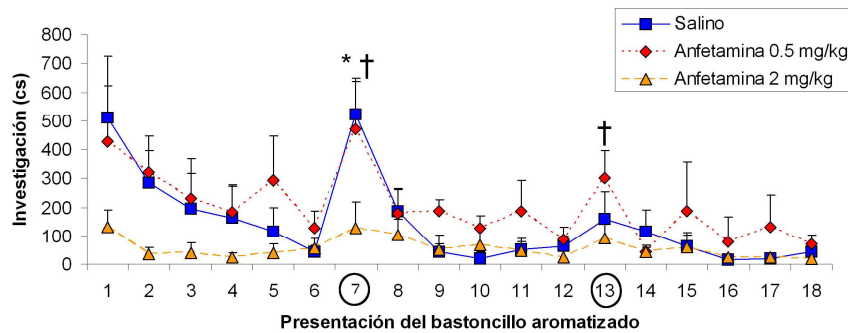


Figura 17. Efecto de la anfetamina en el test de habituación-deshabitación utilizando olores neutros.

Los círculos señalan el momento de la presentación de cada estímulo nuevo. Los animales tratados con la dosis alta se comportaron como funcionalmente anósmicos, mientras que la dosis baja mejoró la discriminación entre los dos olores neutros. *= $p < 0.05$ en el grupo salino; †= $p < 0.05$ en el grupo tratado con anfetamina 0.5 mg/kg.

Experimento 1.C: Efecto de los antagonistas de la dopamina sobre la adquisición de preferencia de lugar condicionada por feromonas de macho

Para analizar los datos de este experimento, primero comprobamos que la localización de la viruta de macho a la derecha o a la izquierda de la caja ($n=5$ para cada lado y grupo, ver Tabla 9) no afectaba al tiempo que los ratones pasaban en las inmediaciones del estímulo. Mediante un análisis t-Student comparamos esta variable en el primer día de entrenamiento (Figura 18), análisis que demostró que los animales exploraban por igual la viruta de macho independientemente de su posición (Salino, $p=0.638$; SCH 0.05 mg/kg, $p=0.574$; Sulp 20 mg/kg,

$p=0.934$), y por tanto los datos procedentes de ambos subgrupos se agruparon para análisis posteriores.

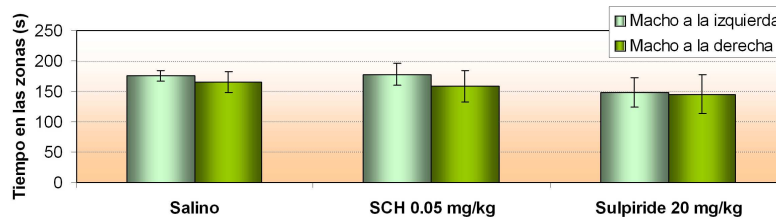


Figura 18. Tiempo en la zona delimitada alrededor de la viruta de macho durante la primera sesión de entrenamiento en el experimento de preferencia condicionada de lugar bajo tratamiento con los antagonistas dopaminérgicos.

A continuación, con un ANOVA de medidas repetidas comparamos el tiempo que los animales pasaban en cada zona antes (*control*, viruta limpia *vs* viruta limpia) y después (*test de preferencia condicionada de lugar*, viruta limpia *vs* viruta limpia) de las sesiones de entrenamiento. Los factores intra-sujetos fueron TEST (*control*, *test de preferencia condicionada de lugar*) y LADO (*zona reforzada*, *zona no reforzada*), y GRUPO (Salino, SCH 0.05 mg/kg, Sulp 20 mg/kg) el factor entre-sujetos. Este análisis reveló un efecto significativo del factor LADO ($F_{1, 27}=26.525$, $p<0.001$) y de la interacción TEST x LADO ($F_{1, 27}=9.989$; $p=0.004$). Por otro lado, ni los factores TEST ($F_{1, 27}=1.2$, $p>0.283$) ni GRUPO ($F_{2, 27}=0.323$; $p=0.727$), ni las interacciones TEST x GRUPO ($F_{2, 27}=0.089$, $p<0.915$), LADO x GRUPO ($F_{2, 27}=0.854$, $p<0.437$) y TEST x LADO x GRUPO ($F_{2, 27}=0.582$, $p<0.565$) contribuyeron de manera significativa a las diferencias encontradas en las medias.

Seguidamente, las comparaciones por parejas entre las medias marginales estimadas del factor LADO en cada TEST revelaron que no había diferencias entre el tiempo que las hembras pasaban en cada área

en el control ($p < 0.573$), pero sí en el test de preferencia condicionada de lugar ($p < 0.001$). Es decir, la presencia de feromonas de macho en la zona reforzada durante las sesiones de entrenamiento incrementó el tiempo pasado por los animales en este área, es decir, provocó una preferencia condicionada de lugar (Figura 19). Además, la falta de efecto del factor GRUPO y de sus interacciones con el resto de factores demostró que el tratamiento, previo a las sesiones de entrenamiento, con los antagonistas dopaminérgicos, no fue efectivo para bloquear la adquisición de esta preferencia condicionada de lugar.

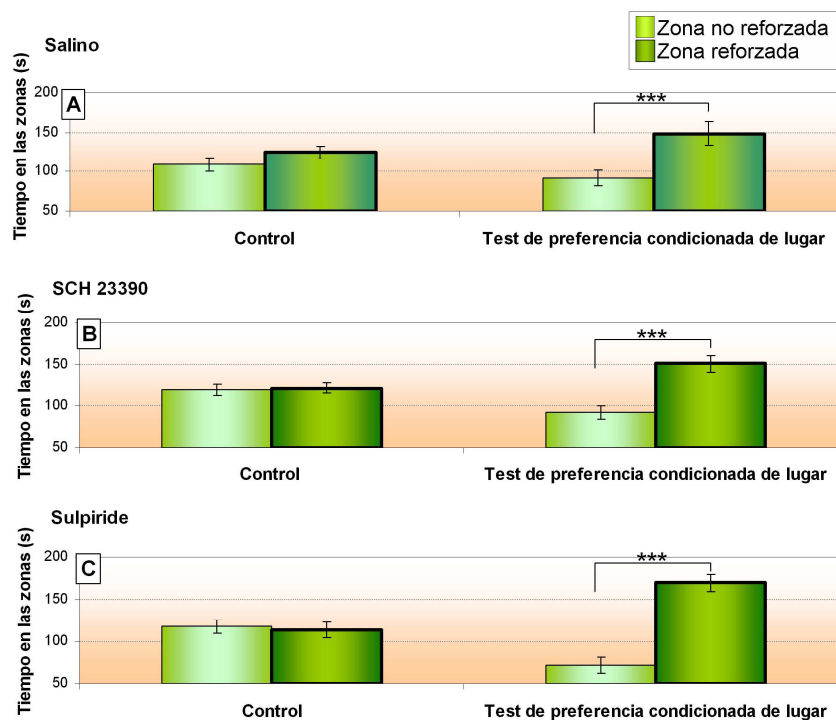


Figura 19. Efecto del tratamiento con antagonistas dopaminérgicos sobre la adquisición de preferencia de lugar condicionada por feromonas de macho.

Tiempo en las zonas reforzada y no reforzada en el control y el test de preferencia condicionada de lugar. El tratamiento con los antagonistas de dopamina durante el entrenamiento no impide el desarrollo de una preferencia de lugar condicionada por las feromonas de macho. ***= $p < 0.001$

Experimento 1.D: Efecto de fármacos con actividad noradrenérgica sobre la atracción innata por feromonas de macho

Experimento 1.D.1: Efecto de la desipramina

Recordemos que la desipramina actúa principalmente como un inhibidor de la recaptación de noradrenalina (Tabla 1, página 51), y por lo tanto es un agonista indirecto de este neurotransmisor.

El tratamiento con ambas dosis de desipramina disminuyó la locomoción de los animales (ANOVA entre grupos, $F_{2, 29}=11.609$, $p<0.001$; análisis post-hoc de Dunnett, Des 10 mg/kg, $p<0.001$; Des 20 mg/kg, $p=0.001$) (Figura 20A), pero no afectó al tiempo total dedicado a la investigación en el *control post-tratamiento* (ANOVA entre grupos, $F_{2, 29}=0.140$, $p=0.870$) (Figura 20B)

Seguidamente analizamos el tiempo dedicado por las hembras a la investigación de las feromonas en el *control post-tratamiento* y en el *test de preferencia por feromonas de macho* (recordemos que a partir de este momento, los datos que se ofrecen son de tiempo en las zonas delimitadas alrededor de los estímulos registrados mediante un sistema de captación automática de imágenes (SMART) y no de investigación estrictamente hablando). El ANOVA para medidas repetidas reveló efectos significativos de las interacciones TEST x LADO x GRUPO ($F_{2, 29}=8.032$, $p=0.002$) y LADO x TEST ($F_{2, 29}=41.967$, $p<0.001$), así como de los factores TEST ($F_{1, 29}=13.096$, $p=0.001$) y LADO ($F_{1, 29}=60.855$, $p<0.001$). Por otro lado, no fueron significativas las interacciones LADO x GRUPO ($F_{2, 29}=1.032$, $p=0.369$), TEST x GRUPO ($F_{2, 29}=0.791$,

$p=0.466$) ni el factor GRUPO ($F_{2, 29}=0.026$, $p=0.975$). Las comparaciones por parejas entre LADO en cada TEST y GRUPO revelaron que existía preferencia por las feromonas de macho en todos los grupos (SAL, $p<0.001$; Des 10 mg/kg, $p<0.001$; Des 20 mg/kg, $p=0.003$), pero también una preferencia inesperada por uno de los lados en el *control post-tratamiento* en el grupo tratado con la dosis alta de desipramina ($p=0.012$), que no se daba en los otros dos grupos (Salino, $p=0.385$, Des 10 mg/kg $p=0.579$) (Figura 20C).

Por lo que respecta al comportamiento de escarbar, los tratamientos no afectaron a la suma del tiempo escarbando en la viruta de hembra en el *control post-tratamiento* (Kruskal-Wallis, $p=0.340$), ni al escarbado preferencial de la viruta de macho (Wilcoxon, Salino, $p=0.011$; Des 10 mg/kg, $p=0.005$; Des 20 mg/kg, $p=0.018$), aunque el tiempo escarbando en la viruta de macho se vio afectado de manera marginalmente significativa, debido a una reducción provocada por la dosis alta que puede apreciarse en la Figura 20E (Kruskal-Wallis, $p=0.066$).

En conclusión, la dosis baja de desipramina, a pesar de reducir significativamente la locomoción, no afectó a ninguno de los comportamientos relacionados con la preferencia por señales químicas masculinas (tiempo en la zona que contenía feromonas de macho ni escarbado preferencial). Aunque los datos de la dosis alta son más difícilmente interpretables debido al desequilibrio mostrado en la situación control, cuando los estímulos a cada lado son idénticos (feromonas de hembra), los análisis demostraron que los animales de este

grupo también mostraban preferencia por las feromonas de macho, así como un escarbado preferencial de la viruta que contenía las mismas.

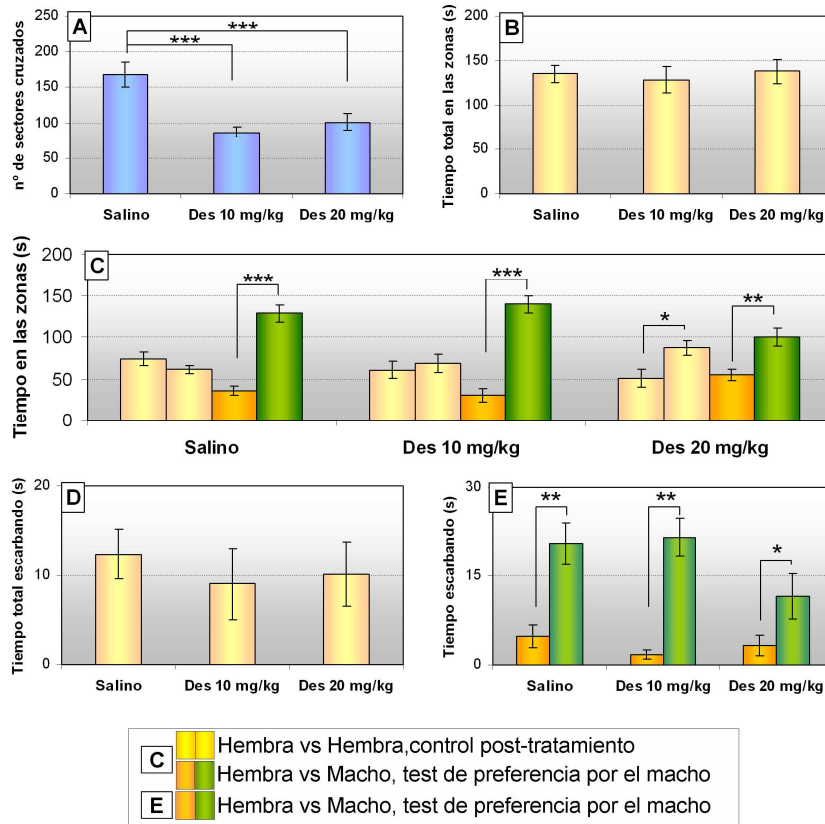


Figura 20. Efecto de la desipramina sobre la atracción innata por feromonas de macho y el comportamiento de escarbado.

A. Locomoción; suma de los sectores cruzados en el control post-tratamiento y el test de preferencia por las feromonas de macho. B. Tiempo total en las zonas; suma de la investigación de ambos recipientes en el control post-tratamiento. C. Tiempo en las zonas; tiempo investigando cada recipiente en el control post-tratamiento y el test de preferencia por feromonas de macho. D. Tiempo total escarbando; suma del tiempo escarbando en ambos recipientes en el control post-tratamiento. E. Tiempo escarbando en cada recipiente en el test de preferencia por feromonas de macho. *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$

Experimento 1.D.2: Efecto de la yohimbina

El tratamiento con yohimbina no afectó a la movilidad de los animales (t de Student entre grupos, $t_{22}=-1.273$, $p=0.216$, Figura 21A) aunque disminuyó ligeramente el tiempo total en las zonas que contenían los estímulos en el *control post-tratamiento* ($t_{22}=2.106$, $p=0.047$) (Figura 21B)

De nuevo, la preferencia por feromonas de macho no se vio afectada en ningún sentido por el tratamiento. El ANOVA para medidas repetidas reveló efectos significativos de la interacción TEST x LADO ($F_{1,22}=57.793$, $p<0.001$) y del factor LADO ($F_{1,22}=18.309$, $p<0.001$). Por el contrario, ni las interacciones TEST x LADO x GRUPO ($F_{1,22}=1.964$, $p=0.175$) LADO x GRUPO ($F_{1,22}=0.532$, $p=0.473$) y TEST x GRUPO ($F_{1,22}=0.136$, $p=0.715$) ni el factor TEST ($F_{1,22}=1.661$, $p=0.211$) fueron significativos, mientras que el factor GRUPO sólo mostró un efecto marginalmente significativo ($F_{1,22}=3.517$, $p=0.074$). Las comparaciones por parejas entre LADO en cada TEST revelaron una preferencia significativa por las feromonas de macho en el test correspondiente ($p<0.001$). De nuevo, la ausencia de efecto del factor GRUPO y de sus interacciones con el resto de factores muestra que la yohimbina, al menos a la dosis empleada, no afecta a la preferencia por feromonas de macho (Figura 21C).

En cuanto al comportamiento de escarbar, una prueba t de Student reveló que el tratamiento disminuyó el tiempo dedicado a escarbar en el *control post-tratamiento* ($t_{22}=2.705$, $p=0.013$) (Figura 21D).

Para finalizar, aplicamos un ANOVA de medidas repetidas al tiempo escarbando ambos tipos de viruta en el test de preferencia por feromonas de macho, con el factor intra-sujetos LADO.

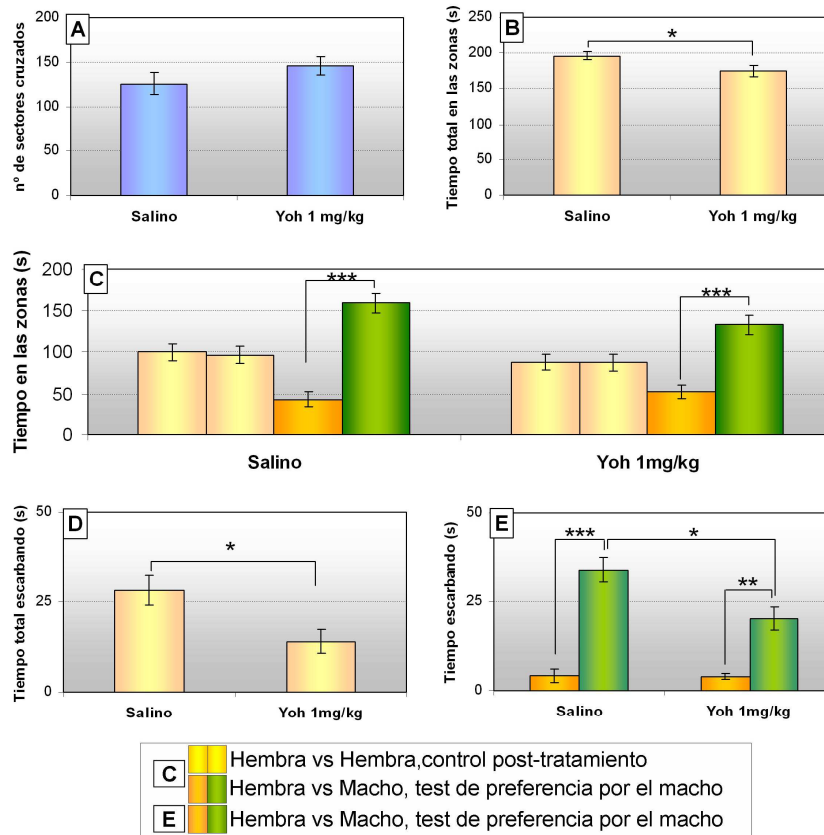


Figura 21. Efecto de la yohimbina en la atracción innata por feromonas de macho y el comportamiento de escarbar.

A. Locomoción; suma de los sectores cruzados en el control post-tratamiento y el test de preferencia por las feromonas de macho. B. Tiempo total en las zonas; suma de la investigación de ambos recipientes en el control post-tratamiento. C. Tiempo en las zonas; tiempo investigando cada recipiente en el control post-tratamiento y el test de preferencia por feromonas de macho. D. Tiempo total escarbando; suma del tiempo escarbando en ambos recipientes en el control post-tratamiento. E. Tiempo escarbando en cada recipiente en el test de preferencia por feromonas de macho. *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$

El resultado de este análisis mostró efectos significativos de los factores LADO ($F_{1, 22}=44.203$, $p < 0.001$) y GRUPO ($F_{1, 22}=5.608$,

$p=0.027$), así como un efecto marginalmente significativo de su interacción ($F_{1, 22}=3.930$, $p=0.060$). Las comparaciones por parejas mostraron un efecto significativo del factor LADO en cada grupo (Salino, $p<0.001$, Yoh 1 mg/kg, $p=0.003$), mientras que el efecto de GRUPO resultó significativo sólo en el lado que contenía las feromona de macho (Zona con hembra, $p=0.839$; Zona con macho, $p=0.036$).

Por lo tanto, la dosis empleada de yohimbina no influyó sobre el comportamiento de preferencia por feromonas de macho, pese a disminuir globalmente el tiempo pasado por los animales en las zonas cuando estas contenían viruta ensuciada por hembras (*control post-tratamiento*, Figura 21B) y disminuir significativamente el comportamiento de escarbar, tanto sobre la viruta de hembra (Figura 21D) como específicamente sobre la viruta de macho (Figura 21E)

4.1.4 Discusión

Nuestros resultados indican que el valor atractivo innato que poseen las feromonas sexuales masculinas para las hembras de ratón no se ve afectado al someterlas a un tratamiento con antagonistas de los receptores D1 o D2 de la dopamina. Por el contrario, las drogas que incrementan la transmisión dopaminérgica, especialmente a través del receptor D1, eliminan la preferencia de los ratones hembra por investigar las señales químicas de macho. Además, la adquisición de una preferencia de lugar condicionada por feromonas de macho no se ve comprometida por el bloqueo farmacológico de D1 o D2 durante el entrenamiento. Por último, los fármacos agonistas noradrenérgicos empleados no tuvieron un efecto significativo sobre el comportamiento de preferencia innata por feromonas de macho.

Efectos sensoriales y motores de las drogas utilizadas

Para interpretar adecuadamente los resultados de los experimentos recién expuestos debemos tener en cuenta los efectos de los fármacos utilizados que pudieran interferir en la expresión de la preferencia por feromonas de macho.

En primer lugar, en concordancia con algunos estudios en ratón (Geter-Douglass *et al.*, 1997), algunas de las dosis de agonistas dopaminérgicos afectaron a la locomoción, pudiendo por tanto inducirnos a error al interpretar la falta de motivación por explorar las feromonas como una incapacidad motora para hacerlo. Sin embargo, al analizar los datos con detenimiento encontramos argumentos para

descartar esta posibilidad. Así pues, mientras el comportamiento de escarbar, que supone un gran esfuerzo motor, se hallaba profundamente afectado en los animales cuya locomoción estaba alterada (como bajo el efecto de los agonistas dopaminérgicos, ver Figura 15A, D, E y Figura 16A, D, E), los efectos observados sobre la investigación de las feromonas no están correlacionados con los efectos sobre la locomoción. Por ejemplo, la dosis baja de amfetamina eliminó la preferencia sin afectar a la locomoción, mientras que la dosis alta de SCH 23390 y el quinpirol no afectaron a la preferencia a pesar de disminuir significativamente el número de cruces entre sectores realizado por los animales. Por tanto, la falta de preferencia de los animales tratados con SKF 38393 y amfetamina puede ser debida más probablemente a efectos sobre la motivación que sobre la locomoción.

Por su parte, el comportamiento exploratorio en general se mostró bastante insensible a las drogas y dosis analizadas, de las cuales, sólo el SKF 38393 (agonista de D1) y la yohimbina (antagonista α_2) la disminuyeron. Tampoco en este caso se pudo relacionar el valor de este parámetro con la preferencia por el macho en todos los casos, ya que, mientras el SKF eliminó la investigación preferencial, no sucedió lo mismo con la yohimbina (ver Figura 16B, C y Figura 21B, C).

De la misma manera, la falta de preferencia no parece ser atribuible a un déficit sensorial. A pesar de que los animales tratados con la dosis alta de amfetamina se comportaron como funcionalmente anósmicos en el test de detección de un olor neutro, los tratados con la dosis baja, que eliminaba de la misma manera la preferencia por feromonas de macho, presentaban una función olfativa normal. Además,

las feromonas que resultan innatamente atractivas para las hembras son detectadas por el sistema vomeronasal (Martínez-Ricós *et al.*, *in press*), siendo el bulbo olfativo accesorio mucho más pobre en dopamina que el bulbo olfativo principal, a razón de la expresión de la enzima tirosina hidroxilasa (ver Figura 10) (Baker, 1986; observaciones realizadas sobre la colección histológica de nuestro laboratorio), y de la falta de neuronas periglomerulares dopaminérgicas (Shipley *et al.*, 1995). Por tanto, parece improbable que la transmisión dopaminérgica alterada provoque una *anosmia vomeronasal*.

Con todos estos datos, podemos estar suficientemente seguros de que el efecto de inhibición de la preferencia por parte de los agonistas se debe a un efecto específico sobre la motivación por explorar las feromonas de macho, y no a posibles afectaciones sensoriales o motoras.

Contribución de las distintas catecolaminas a la atracción innata por feromonas de macho

De los resultados obtenidos en los experimentos 1.B y 1.C se desprende que la anfetamina, en la dosis menor, fue la única droga que eliminó la atracción innata por feromonas de macho sin efectos apreciables sobre las medidas de comportamiento general estudiadas (locomoción, investigación total, discriminación de olores neutros). Sin embargo, esta droga actúa con una afinidad similar tanto sobre el transportador de dopamina como sobre el de noradrenalina, y en menor medida sobre el de serotonina (Kuczenski y Segal, 1989; Rothman *et al.*, 2001), de modo que la inhibición de la preferencia provocada por la anfetamina podría deberse a sus acciones sobre los otros sistemas.

No obstante, los resultados de otros experimentos indican que este no es el caso. En primer lugar, el agonista específico de D1 eliminó la preferencia por feromonas masculinas en la misma medida que la anfetamina. Si bien es cierto que lo hizo a dosis que disminuyeron de manera notable tanto la locomoción como la investigación general, estos efectos fueron similares a los provocados por el agonista D2, que sin embargo no afectó a la atracción por feromonas sexuales de macho (ver punto anterior). En segundo lugar, la desipramina, un potente inhibidor de la recaptación de noradrenalina (y de serotonina en menor medida) (Owens *et al.*, 1997) pero sin actividad dopaminérgica, no afectó a la preferencia por feromonas de macho, ni siquiera dosis que provocaron efectos significativos sobre el comportamiento general de los animales.

Por lo tanto, estamos en condiciones de sugerir que la dopamina, actuando presumiblemente a través de los receptores D1, juega un papel inhibitorio sobre el comportamiento de atracción por señales químicas de macho, al menos en la primera experiencia de las hembras con las mismas.

Por otra parte, nuestros resultados no arrojan una conclusión clara acerca del papel de la transmisión noradrenérgica en la preferencia innata por feromonas masculinas, ya que ninguna de las drogas utilizadas afectó a la exploración preferente en ningún sentido. En todo caso, moviéndonos en el marco del comportamiento sexual (ver punto siguiente) y en base a estudios previos, era esperable que si las drogas noradrenérgicas producían algún efecto, éste debiera ser el de incrementar la motivación de los animales por explorar las feromonas de macho (González *et al.*, 1997; Viitamaa *et al.*, 2006). La presencia de un

posible efecto techo en nuestro protocolo se considerará en la Discusión General.

La apetencia por feromonas como parte del comportamiento sexual

Si consideramos la búsqueda de las feromonas de un congénere del sexo opuesto como parte del comportamiento para-copulatorio (Blaustein y Erskine, 2002), podemos intentar explicar nuestros resultados en el marco más amplio del comportamiento sexual. De hecho, existen evidencias de que la detección de las feromonas sexuales durante la cópula puede formar parte de la recompensa que supone el sexo. Así, Del Punta y colaboradores (2002) eliminaron mediante ingeniería cromosómica dieciséis genes de receptores vomeronasales (V1r), y comprobaron que los machos con esta delección sufren una pérdida progresiva del comportamiento sexual. Esta respuesta contrasta con el incremento del comportamiento sexual que muestran los machos control, de la cepa silvestre, a medida que adquieren experiencia sexual. Los autores interpretan este hecho como demostrativo de que parte del valor reforzante del comportamiento sexual es debido a la estimulación vomeronasal durante la cópula (Del Punta *et al.*, 2002).

Por lo tanto, algunos de los efectos de las drogas dopaminérgicas sobre el comportamiento sexual de los animales macrosmáticos podrían estar relacionados con sus efectos sobre el procesado de la información feromonal. En este contexto, el papel que la transmisión dopaminérgica juega en la coordinación del comportamiento sexual de las hembras dista de estar claro, habiéndose encontrado una mayoría de efectos inhibidores

(Everitt *et al.* 1974; Crowley *et al.*, 1978; Grierson *et al.*, 1988), o nulos (Hansen *et al.*, 1991); pero también facilitadores (para una revisión a este respecto, ver Paredes y Agmo, 2004). Por el contrario, la noradrenalina sí parece implicada en un incremento de varias medidas de comportamiento sexual (Crowley *et al.*, 1978; Gonzalez *et al.*, 1996; Viitamaa *et al.*, 2006).

Nuestros resultados están de acuerdo con algunos datos previos respecto a los efectos de diversas drogas dopaminérgicas en roedores. Por ejemplo, Ellingsen y Agmo (2004), muestran que el agonista dopaminérgico inespecífico apomorfina disminuye la preferencia de ratas hembra por un compartimento que contiene un macho frente a otro con un macho castrado, mientras que distintos antagonistas de la dopamina no tienen efecto en este test. Los autores argumentan que de hecho la dopamina no debe jugar ningún papel en la motivación sexual de las hembras, puesto que la apomorfina disminuye la preferencia sólo a dosis que alteran la movilidad de los sujetos. Sin embargo, como hemos visto más arriba, en nuestro caso la afectación locomotora no siempre va relacionada a una pérdida de preferencia y viceversa. Por otro lado, en ratones machos la anfetamina disminuye la preferencia por un compartimento habitado por una hembra frente a uno vacío (Landauer y Balster, 1982a). En ambos estudios, los sujetos experimentales no tenían acceso a los sujetos utilizados como estímulo y, aunque es cierto que existen además señales acústicas y visuales para la comunicación intra-específica, nuestros resultados sugieren que la pérdida de interés por el congénere del sexo opuesto puede deberse, en animales macrosmáticos, a una pérdida de interés por sus señales químicas.

Un nuevo modelo para el estudio de las propiedades hedónicas independientes de dopamina de una recompensa

La conclusión principal de los resultados de este capítulo, como hemos visto, es que la dopamina no es el agente causal del refuerzo inducido por feromonas. Este resultado casa con resultados previos mostrando, primero, que la detección de feromonas no activa las neuronas del área ventral tegmental (utilizando el c-fos como marcador, Moncho-Bogani *et al.*, 2005), y, lo que es más, que la destrucción selectiva de las neuronas dopaminérgicas del área ventral tegmental mediante inyecciones estereotáxicas de 6-OH-dopamina (tóxico específico de las neuronas dopaminérgicas) no afecta a la preferencia innata de las hembras por feromonas sexuales de macho (Martínez-Hernández *et al.*, 2006). Todos estos resultados apoyan la visión actual de que la vía dopaminérgica tegmento-estriatal no es la causa del impacto *hedónico* de las recompensas naturales. Entre las evidencias acumuladas a este respecto, citamos por ejemplo el estudio de Peciña y colaboradores (1997), que muestra cómo el bloqueo farmacológico de los receptores D2 de dopamina mediante el antagonista pimozide no afecta a las expresiones faciales relacionadas con la sensación placentera en ratas a las que se les facilita una solución azucarada; resultados similares se obtienen en ratas con lesiones selectivas del área ventral tegmental con 6-OH-dopamina que, sin embargo, son prácticamente afágicos (Berridge y Robinson, 1998). Además, los agonistas de dopamina no son efectivos para incrementar estos comportamientos (Wyvell y Berridge, 2000).

Nosotros proponemos que el comportamiento que estamos estudiando, la preferencia de las hembras químicamente vírgenes por las feromonas de macho, se relaciona con las propiedades hedónicas de la recompensa, del mismo modo que lo están las expresiones faciales afectivas. Según las últimas teorías dominantes, el refuerzo podría fragmentarse en tres componentes: *hedonia* (emoción o afecto, placer), apetencia (motivación, adquisición de saliencia incentiva) y aprendizaje (incluyendo asociaciones pavlovianas e instrumentales) (ver Justificación, Berridge y Robinson, 2003). De ser esto cierto, durante la primera experiencia con las feromonas, cuando no es posible que haya ocurrido ningún proceso de aprendizaje, el único componente de los arriba mencionados que puede tener una influencia sobre el comportamiento es la *hedonia*, dado que tanto la apetencia como el aprendizaje dependen de la experiencia previa del animal con la recompensa, que le permita reconocer los estímulos asociados a ella y responder a los mismos. Así pues, podemos sugerir que durante la primera experiencia de las hembras con las feromonas de macho, los sujetos muestran preferencia por éstas debido a sus propiedades hedónicas. Sin pistas acerca de la existencia de una recompensa en los botes, dado que necesitan el contacto directo con los mismos (Martínez-Ricós *et al.*, 2007), la aproximación a uno u otro debe ser aleatoria, y sin embargo, cuando los animales encuentran las feromonas de macho, éstas inducen en ellas una investigación intensa y persistente. Algo similar ocurre cuando un animal que nunca ha tenido experiencia con la sacarosa se somete a un test en el cual se le ofrece una botella con agua y otra con una solución dulce. En este paradigma, ratones juveniles deficientes para la dopamina muestran una preferencia

clara por la sacarosa, medida como los lametones largos y continuados que realizan en la botella que contiene la solución azucarada en comparación con la botella de agua (Cannon y Palmiter, 2003).

Así pues, todo apunta a que la dopamina es irrelevante para el componente hedónico del refuerzo, como puede ser comprobado mediante esta variedad de pruebas durante la primera experiencia con una recompensa natural.

Vías neurales del procesado del refuerzo: efecto modulador de la dopamina a través de los receptores D1

Recordemos que las feromonas sexuales que resultan innatamente atractivas y reforzantes para las hembras son detectadas por el órgano vomeronasal, dado que la destrucción del bulbo olfativo accesorio elimina tanto la preferencia de las hembras por feromonas de macho como la capacidad para adquirir preferencia por los olores volátiles que emanan de la viruta ensuciada por ellos (Martínez-Ricós *et al.*, *in press*). El bulbo olfativo accesorio proyecta a la amígdala vomeronasal, que a su vez envía sus proyecciones a un territorio del estriado ventral que comprende los puentes celulares del estriado ventral y los islotes de Calleja mediales, incluido el magno (Novejarque, 2007; Úbeda-Bañón *et al.*, *in press*). La importancia de estas proyecciones se estudiará en detalle en los puntos 4.3 y 4.4 de esta tesis.

El papel tanto de la amígdala vomeronasal como del estriado ventral en el refuerzo se apoya en experimentos de autoestimulación (Kane *et al.*, 1991; Prado-Alcalá y Wise, 1994). La activación de las neuronas del estriado ventral gracias a la proyección glutamatérgica de la

amígdala vomeronasal puede estar relacionada, por tanto, con el impacto hedónico de las feromonas. Si esto es cierto, la observación de Charara y Grace, (2003) de que la dopamina, actuando a través de los receptores D1, atenúa los efectos de la estimulación de las neuronas estriatales espinosas por los aferentes amigdalinos que llegan a través de la *stria terminalis*, proporciona una explicación plausible a nuestro resultado mostrando que las drogas dopaminérgicas, a través de los receptores D1, pueden inhibir la atracción innata por feromonas de macho.

Falta de efecto de los antagonistas dopaminérgicos en la adquisición de preferencia de lugar condicionada por feromonas de macho

Según nuestros resultados, ni los antagonistas del receptor D1 ni los de D2 son capaces de afectar al condicionamiento de preferencia de lugar. Existe una extensa literatura acerca de los efectos de antagonistas dopaminérgicos en la inducción de preferencia de lugar condicionada por comida, agua o sexo. Por ejemplo, la adquisición de preferencia de lugar condicionada por una solución de sacarosa resulta bloqueada por el antagonista dopaminérgico flupentixol en rata (Agmo *et al.*, 1995); en ratones el SCH 23390 (antagonista de D1) es efectivo para bloquear la adquisición de preferencia de lugar condicionada por aceite de maíz (Imaizumi *et al.*, 2000). Merece reseñarse que las dosis que previenen el condicionamiento no afectan al consumo no restringido de las sustancias empleadas como recompensa (ver arriba la argumentación sobre las propiedades hedónicas primarias de las recompensas naturales).

Estos resultados sugieren que en paradigmas que utilizan estímulos alimenticios, los sustratos neurales que controlan las propiedades hedónicas de las recompensas y los procesos de aprendizaje asociados a ellos son distintos, siendo las primeras independientes de la dopamina (Agmo *et al.*, 1995).

Sin embargo, para otra recompensa natural como es el sexo, la literatura ofrece resultados aparentemente contradictorios. Por ejemplo, en hembras de hámster, el antagonista del receptor D2 raclopride bloquea la adquisición de preferencia condicionada a un compartimento asociado con la cópula, mientras que el sulpiride no llega a ser significativamente efectivo (Meisel *et al.*, 1996). De hecho, ni el raclopride ni el flupentixol afecta a la adquisición de preferencia condicionada de lugar tras cópula controlada por la hembra en ratas (García y Paredes, 2004), resultados que son consistentes con los nuestros, dado que la adquisición de preferencia condicionada de lugar por las feromonas de macho tampoco se ve afectada por los antagonistas dopaminérgicos.

En conclusión, todos estos resultados sugieren una modulación diferente de los refuerzos relacionados con la ingesta y con el comportamiento sexual, como también se verá en el punto siguiente, dedicado a los opiáceos.

4.2 PAPEL DE LOS SISTEMAS OPIOIDÉRGICOS EN EL REFUERZO INDUCIDO POR FEROMONAS DE MACHO

4.2.1 Justificación

Tras estudiar la dopamina, nos propusimos el análisis de los efectos de la manipulación farmacológica del otro sistema relevante en el control de los comportamientos guiados por refuerzo, el sistema de los opiáceos endógenos (Van Ree *et al.*, 2000).

Las neuronas que expresan estos neuropéptidos los sintetizan en forma de precursores; de esta manera, el péptido proencefalina da lugar a la encefalina, la prodinorfina a la dinorfina y la proopiomelanocortina a la β -endorfina (Loughlin *et al.*, 1995). Estos péptidos se localizan principalmente en interneuronas inhibitorias, aunque también pueden presentarse en neuronas de proyección; por ejemplo, las neuronas espinosas de las vías estriato-palidales *directa* e *indirecta* coexpresan el GABA con la dinorfina y la encefalina respectivamente (Fallon y Leslie, 1986; Gerfen y Young, 1988). Por otra parte, las neuronas de proyección que expresan β -endorfina se localizan fundamentalmente en el hipotálamo y envían sus axones principalmente al septum, *núcleo del lecho de la stria terminalis* y amígdala (Loughlin *et al.*, 1995).

Los opiáceos endógenos actúan sobre tres tipos de receptores que presentan una amplia distribución en el sistema nervioso central (Hekerman y Pert, 1980; Moskowitz y Goodman, 1984; Van Ree *et al.*,

1999). Los distintos tipos de péptidos opioides tienen cierto grado de selectividad por cada tipo de receptor; de esta manera, la encefalina se une con mayor afinidad a los receptores δ , la β -endorfina a los receptores μ y la dinorfina a los receptores de tipo κ , aunque generalmente pueden interaccionar de manera bastante promiscua con todos ellos (Waldhoer *et al.*, 2004). Nótese además que mientras los agonistas de los receptores μ y δ son generalmente analgésicos y reforzantes, ocurre lo contrario con los agonistas κ .

Los opiáceos endógenos están presentes en neuronas de muchos centros nerviosos, participando en el control de comportamientos esenciales para la supervivencia como la alimentación, la analgesia y el comportamiento sexual (Bodnar y Klein, 2005). En relación al comportamiento ingestivo, está bien establecido que estos neuropéptidos no sólo regulan la alimentación (Jalowiec *et al.*, 1981; Mucha e Iversen, 1986), sino que proporcionan la sensación hedónica provocada por los alimentos, como la del sabor dulce (Kelley *et al.*, 2002). En concreto, la señalización opioidérgica en ciertos *puntos calientes* del estriado ventral se ha descrito como clave en este punto (Peciña y Berridge, 2005; Smith y Berridge, 2007).

Muy al contrario, el papel de los opiáceos en el comportamiento sexual es fundamentalmente inhibitorio tanto en machos como en hembras (Pfaus y Gorzalka, 1987; Argiolas, 1999), aunque existen evidencias contrarias, como el hecho de que bajo ciertas condiciones la activación de los receptores μ en el área ventral tegmental pueda incrementar la motivación sexual de machos de rata (van Furth y van Ree, 1996). Precisamente se cree que las propiedades reforzantes de las

drogas opioidérgicas se deben a sus efectos sobre el área ventral tegmental, donde pueden provocar efectos tanto dependientes como independientes de la dopamina (van Ree *et al.*, 1999). En el primer caso, se sabe que la activación de los receptores opiáceos en este núcleo da lugar a una activación de las neuronas dopaminérgicas (Rompré y Wise, 1989; Henry *et al.*, 1992); de hecho, se han observado déficits en las respuestas condicionadas a la morfina en ratones deficientes para el receptor dopaminérgico D2 (Maldonado *et al.*, 1997; Elmer *et al.*, 2002), así como una participación de los receptores μ -opiáceos en los efectos comportamentales de drogas dopaminérgicas como la cocaína (Gerrits *et al.*, 1995; Kuzmin *et al.*, 1997) que sugieren una estrecha colaboración de ambos sistemas. En contradicción con estos resultados, la morfina puede utilizarse para condicionar una preferencia de lugar en ratones deficientes en dopamina (Hnasko *et al.*, 2005), y viceversa, los ratones deficientes para el receptor μ -opiáceo pueden adquirir preferencia de lugar condicionada por cocaína, aunque a dosis distintas del fenotipo salvaje (Becker *et al.*, 2002). Así pues, aunque ambos sistemas interaccionen en condiciones normales, bajo condiciones especiales como en los ratones *knock out*, las drogas de cada tipo pueden ejercer sus efectos de manera independiente.

Como quiera que sea, está claro que los opiáceos endógenos participan de una manera importantísima en los procesos de refuerzo. Además, se da el caso de que la expresión de receptores μ en los núcleos que podemos considerar como claves en la vía de procesado de las feromonas es de las más importantes en el telencéfalo (Hekerman y Pert,

1980) (Figura 22), lo cual nos induce a pensar en una probable modulación opioidérgica del procesado de la información feromonal.

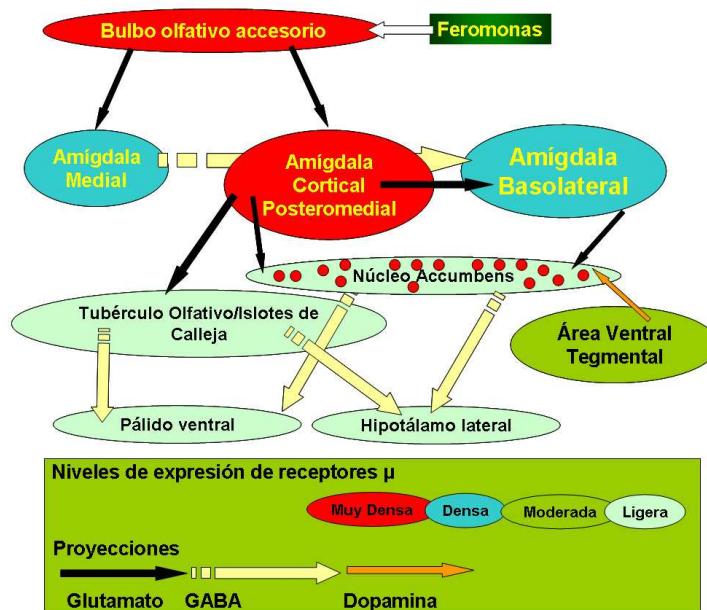


Figura 22. Niveles de expresión del receptor μ -opiáceo en un esquema de la conectividad algunos núcleos de interés.

Las estimaciones en los niveles de expresión son adaptadas de Koob y LeMoal, 2006.

4.2.2 Grupos experimentales

Por todo lo expuesto, el siguiente paso en nuestro estudio fue investigar la existencia de una modulación opioidérgica en el refuerzo inducido por feromonas. Además, dado el mencionado papel de los opiáceos en el consumo y las propiedades hedónicas del sabor dulce (Peciña y Berridge, 2005; Smith y Berridge, 2007), decidimos comenzar estudiando los efectos de un antagonista y un agonista opioidérgicos sobre el consumo preferente de una solución azucarada (Tabla 12). El tiempo entre la administración de la droga y el test comportamental fue de 15 minutos para el antagonista (naloxona) y 30 minutos para el

agonista (fentanilo). Mediante este experimento conseguimos un doble objetivo: por un lado, validar nuestras dosis de cada fármaco, eligiendo aquéllas que mostraron resultados positivos sobre el consumo de sacarosa de acuerdo con los datos publicados en la extensa bibliografía que existe sobre este tema, y por el otro tener un comportamiento guiado por un refuerzo quimiosensorial bien estudiado para comparar el papel de los opiáceos en ambos tipos de refuerzos naturales.

Experimento 2.A: Efecto de fármacos opioidérgicos sobre el consumo preferente de una solución de sacarosa	Fármaco	Dosis (mg/kg)	n
Experimento 2.A.1. Efecto de la naloxona	Salino		9
	Naloxona Antagonista general de opiáceos	1	7
		10	7
Experimento 2.A.2. Efecto del fentanilo	Salino		9
	Fentanilo Agonista específico de receptores μ -opiáceos	0.1	7
		0.5	7

Tabla 12. Grupos experimentales utilizados para explorar el efecto de las drogas opioidérgicas sobre el consumo preferente de una solución azucarada frente a agua.

A continuación, sometimos a las hembras químicamente vírgenes al experimento de preferencia por feromonas de macho bajo tratamiento con un antagonista general de opiáceos por un lado, y con un agonista de los receptores μ por otro (Tabla 13). El tiempo tras la administración de la droga y el test comportamental, como en el experimentos de preferencia por sacarosa, fue de 15 minutos para la naloxona y 30 minutos para el fentanilo. Por último, decidimos comprobar si la activación de los sistemas opioidérgicos era necesaria para el establecimiento de preferencia de lugar condicionada por feromonas de macho, mediante el tratamiento con el antagonista general de opiáceos previo (15 minutos) a las sesiones de entrenamiento (Tabla 14).

Experimento 2.B: Efecto de los fármacos opioidérgicos sobre la atracción innata por feromonas de macho	Fármaco	Dosis (mg/kg)	n
Experimento 2.B.1: Efecto la naloxona	Salino		8
	Naloxona Antagonista general de opiáceos	1	9
		10	8
Experimento 2.B.2: Efecto del fentanilo	Salino		10
	Fentanilo Agonista específico de receptores μ -opiáceos	0.1	9
		0.5	12

Tabla 13. Grupos experimentales utilizados para explorar el efecto de las drogas opioidérgicas sobre la atracción innata por feromonas de macho.

Experimento 2.C: Efecto la naloxona sobre la adquisición de preferencia de lugar condicionada por feromonas de macho	Fármaco	Dosis (mg/kg)	n
Experimento 2.C: Efecto la naloxona sobre la adquisición de preferencia de lugar condicionada por feromonas de macho	Salino		14
	Naloxona Antagonista general de opiáceos	1	14
		10	14

Tabla 14. Grupos experimentales utilizados para explorar el efecto del antagonista opiáceo en la adquisición de preferencia de lugar condicionada por feromonas de macho. El tiempo entre la administración de la droga y el inicio de la sesión de entrenamiento fue de 15 minutos. Cada grupo se dividió en dos subgrupos de 7 animales cada uno, con la zona reforzada a la izquierda o a la derecha respectivamente.

4.2.3 Resultados

Experimento 2.A: Efecto de fármacos opioidérgicos sobre el consumo preferente de una solución de sacarosa

Experimento 2.A.1: Efecto de la naloxona

Los ratones tratados con Salino mostraron una preferencia clara por consumir una solución de sacarosa al 5% (Figura 23A) a pesar de no haberla probado anteriormente. Es decir, la preferencia por un sabor dulce, como la preferencia por feromonas de macho, es incondicionada.

Un análisis t-Student comparando el número de lametones sobre la botella que contenía agua con los lametones sobre la botella con la solución azucarada así lo demostró ($p=0.037$). Muy al contrario, los animales tratados con la naloxona no mostraron preferencia alguna (Nal 1 mg/kg, $p=0.318$; Nal 10 mg/kg, $p=0.522$) (Figura 23A).

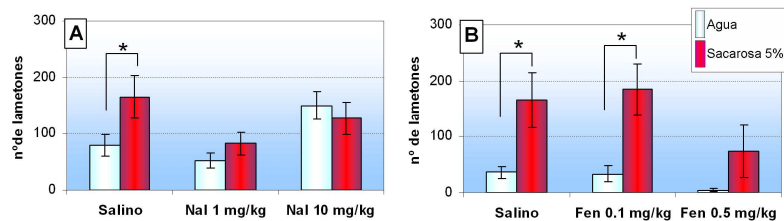


Figura 23. Efecto de las drogas opioidérgicas sobre el consumo preferente de una solución de sacarosa 5% frente a agua.

A. El antagonista opioidérgico eliminó totalmente la preferencia por consumir la solución dulce frente al agua. B. El agonista no afectó a la preferencia normal por la solución de sacarosa a la dosis baja, si bien a la dosis alta provocó una inhibición general de la ingesta de líquidos. *= $p<0.005$

Experimento 2.A.2: Efecto del fentanilo

Los datos de los animales tratados con el agonista de los receptores μ no cumplieron la condición de normalidad y por lo tanto aplicamos un análisis no paramétrico. Los animales tratados con salino y la dosis más baja de fentanilo prefirieron la solución de sacarosa al 5% (test de Wilcoxon, Salino: $p=0.038$; Fen 0.1 mg/kg: $p=0.043$). Por el contrario, la dosis alta de fentanilo inhibió esta preferencia ($p=0.109$) (Figura 23B). Cabe señalar que de los siete animales que había en este grupo, sólo tres bebieron bajo los efectos de la droga, los cuales mostraron una preferencia clara por la solución azucarada, sugiriendo que los efectos de esta dosis se deben a una afectación general del comportamiento ingestivo de los animales, y no son, por tanto, efectos específicos sobre la preferencia por la solución de sacarosa.

Experimento 2.B: Efecto de los fármacos opioidérgicos sobre la atracción innata por feromonas de macho**Experimento 2.B.1: Efecto de la naloxona**

La naloxona no afectó a la locomoción de los animales a ninguna de las dosis empleadas (ANOVA entre grupos, $F_{1, 22}=0.492$, $p=0.618$) (Figura 24A). Tampoco el tiempo total dedicado a investigar las feromonas de hembra se vio perturbado por los tratamientos (ANOVA entre grupos, $F_{2, 22}=2.981$, $p=0.071$) (Figura 24B).

En cuanto a la preferencia por feromonas, el tratamiento no resultó efectivo en ninguna dirección, es decir, el bloqueo farmacológico de los receptores opiáceos no afectó al patrón comportamental de las hembras, que prefirieron las feromonas de macho en todos los casos. El

ANOVA de medidas repetidas con los factores intra-sujetos LADO y TEST y el factor GRUPO como factor entre-sujetos, reveló una falta de interacción entre los factores LADO x TEST x GRUPO ($F_{2, 22}=1.699$, $p=0.211$), LADO x GRUPO ($F_{2, 22}=0.833$, $p=0.448$) y TEST x GRUPO ($F_{2, 22}=0.791$, $p=0.466$), así como falta de efecto principal del factor GRUPO ($F_{1, 22}=2.485$, $p=0.106$). La falta de significatividad del factor GRUPO y de su interacción con el resto de factores indica que el tratamiento no afectó a los animales en las medidas comportamentales estudiadas. Por otro lado, fueron significativos la interacción LADO x TEST ($F_{2, 22}=92.079$, $p<0.001$), y los factores LADO ($F_{1, 22}=27.768$, $p<0.001$) y TEST ($F_{1, 22}=5.864$, $p=0.024$).

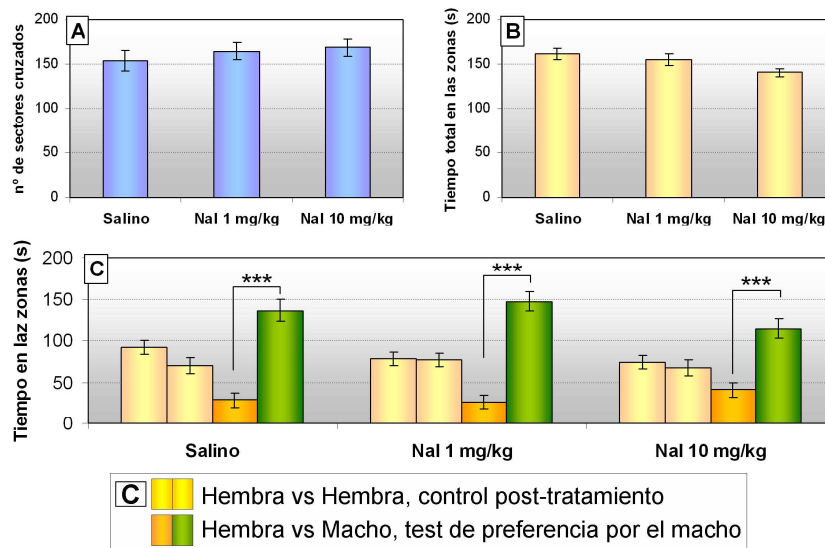


Figura 24. Efecto de un antagonista opiáceo sobre la atracción innata por feromonas de macho.

A. Locomoción; suma de los sectores cruzados en el control post-tratamiento y el test de preferencia por las feromonas de macho. B. Tiempo total en las zonas; suma de la investigación de ambos recipientes en el control post-tratamiento. C. Tiempo en las zonas; tiempo investigando cada recipiente en el control post-tratamiento y el test de preferencia por feromonas de macho. ***= $p<0.001$

Las comparaciones por parejas entre las medias del factor LADO en cada TEST revelaron que las hembras pasaron el mismo tiempo investigando los dos botes en el *control post-tratamiento* ($p=0.291$), pero en cambio mostraron una clara preferencia por el bote que contenía las feromonas de macho en el *test de preferencia por feromonas* ($p<0.001$). El resultado se puede apreciar en la Figura 24C.

Experimento 2.B.2: Efecto del fentanilo

Los animales tratados con la dosis alta del agonista μ mostraron un comportamiento errático y muy variable, lo que provocó que los datos no cumplieren con la condición de normalidad. Por lo tanto, aplicamos análisis no paramétricos.

Una prueba de Kruskal-Wallis para medidas independientes reveló que el fentanilo no afectó de manera significativa ni a la movilidad de los animales ($p=0.906$), ni al tiempo total dedicado a la investigación del estímulo control ($p=0.306$) (Figura 25A, B).

Por otro lado, realizamos análisis de Wilcoxon sobre los datos de investigación de ambos lados en el *control post-tratamiento* y en el *test de preferencia por feromonas de macho*. Los animales no mostraron preferencia por ninguna zona en el primer test (Salino, $p=0.875$; Fen 0.1 mg/kg, $p=0.086$; Fen 0.5 mg/kg, $p=0.374$). Las hembras del grupo Salino prefirieron de manera significativa investigar las feromonas de macho ($p=0.005$), pero no las hembras tratadas con el agonista opiáceo, que no expresaron esta preferencia innata (Fen 0.1 mg/kg, $p=0.884$; Fen 0.5 mg/kg, $p=0.982$) (Figura 25C).

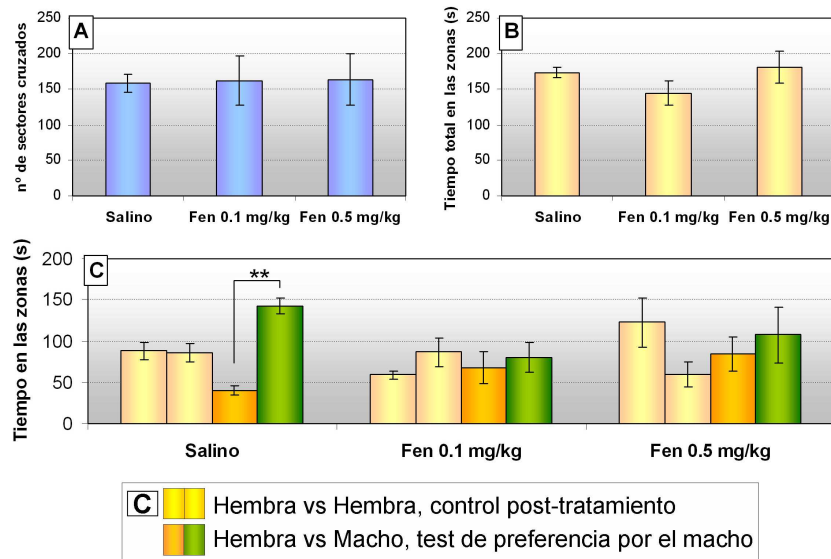


Figura 25. Efecto de un agonista de los receptores μ sobre la atracción innata por feromonas de macho.

A. Locomoción; suma de los sectores cruzados en el control post-tratamiento y el test de preferencia por las feromonas de macho. B. Tiempo total en las zonas; suma de la investigación de ambos recipientes en el control post-tratamiento. C. Tiempo en las zonas; tiempo investigando cada recipiente en el control post-tratamiento y el test de preferencia por feromonas de macho. **= $p < 0.01$

Experimento 2.C: Efecto de la naloxona sobre la adquisición de preferencia de lugar condicionada por feromonas de macho

El análisis t-Student comparando el tiempo de investigación de las feromonas de macho en el subgrupo que las tenía asociadas al lado derecho con el mismo en el subgrupo del lado izquierdo mostró una falta de significatividad de este factor (Figura 26) (Salino, $p=0.351$; Nal 1 mg/kg, $p=0.883$; Nal 10 mg/kg, $p=0.295$), permitiéndonos pues agrupar ambos subgrupos para análisis posteriores.

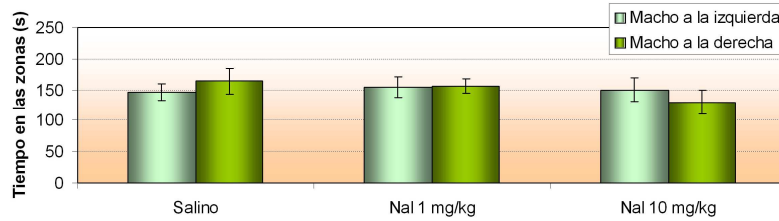


Figura 26. Tiempo en las zonas delimitadas alrededor de la viruta de macho durante la primera sesión de entrenamiento en el experimento de preferencia condicionada de lugar.

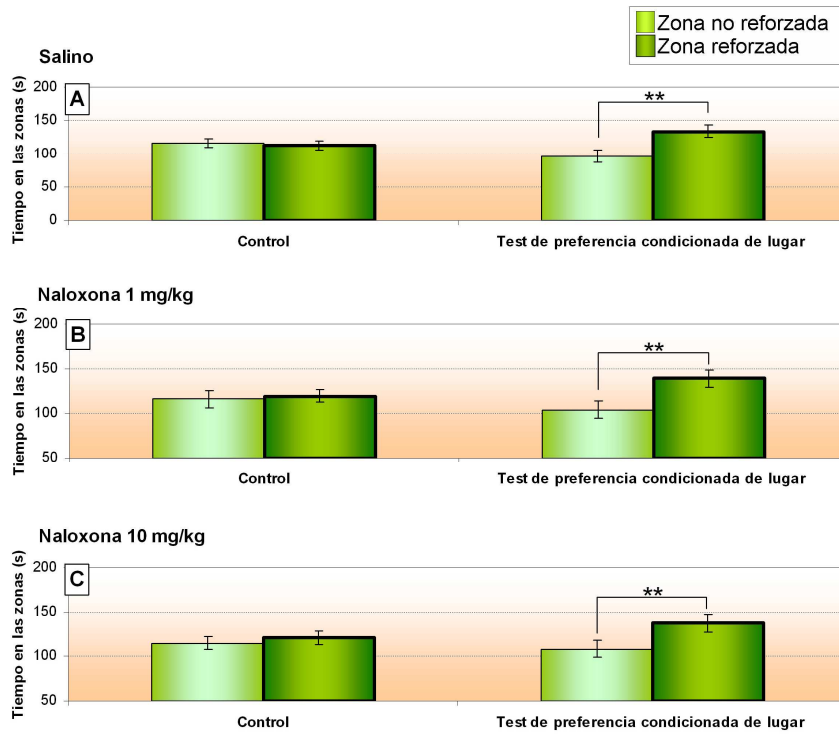


Figura 27. Efecto del antagonista opioidérgico en la adquisición de preferencia de lugar condicionada por feromonas sexuales de macho.

La naloxona no afectó a la adquisición de la preferencia condicionada. **= $p < 0.001$

El ANOVA para medidas repetidas analizando el tiempo pasado por las hembras en el área no reforzada y el área reforzada en el *control* y en el *test de preferencia condicionada de lugar* mostró una falta de interacción

significativa entre los factores TEST x LADO x GRUPO ($F_{2, 39}=0.133$, $p=0.876$) y LADO x GRUPO ($F_{2, 39}=0.007$, $p=0.993$), así como de los factores TEST ($F_{1, 39}=3.363$, $p=0.074$) y GRUPO ($F_{2, 39}=0.991$, $p=0.380$). Por otro lado, la interacción de TEST x GRUPO fue marginalmente significativa ($F_{2, 39}=3.000$, $p=0.061$), mientras que LADO x TEST ($F_{1, 39}=5.627$, $p=0.015$) y el factor LADO ($F_{1, 39}=6.523$, $p=0.015$) fueron significativas. Las comparaciones por parejas entre los lados en cada TEST no revelaron diferencias en el tiempo que pasaban las hembras cerca de cada fuente de feromona en el control ($p=0.784$), mientras que en el test de preferencia condicionada de lugar, las hembras mostraron preferencia por el área reforzada ($p=0.004$) (Figura 27)

4.2.4 Discusión

La atracción innata de las hembras de ratón por feromonas de macho no se vio afectada por el tratamiento con naloxona, mientras que el fentanilo inhibió la exploración preferente de la viruta de macho. El patrón de efectos de estas drogas sobre el consumo preferencial de una solución azucarada frente a agua es exactamente el opuesto. Por último, la adquisición de preferencia de lugar condicionada por feromonas de macho no depende de la activación opioidérgica durante el entrenamiento.

Efecto de los opioides sobre el procesado de la información vomeronasal: inhibición opioidérgica de los comportamientos socio-sexuales

Como sabemos, las feromonas innatamente atractivas para las hembras de ratón son detectadas por el sistema vomeronasal (Martínez-Ricós *et al.*, *in press*), cuyas neuronas sensoriales envían sus proyecciones a los bulbos olfativos accesorios. Los bulbos accesorios a su vez proyectan a la amígdala vomeronasal, que comprende la amígdala medial, la posteromedial cortical y el núcleo del lecho de la *stria terminalis* posteromedial (von Campehausen y Mori, 2000). En consecuencia, aunque la inyección sistémica de los fármacos puede provocar efectos a nivel de todos los núcleos que expresan receptores opiáceos, encontrándose precisamente los núcleos del sistema vomeronasal entre las estructuras con mayor densidad de receptores μ de todo el telencéfalo (Herkeman y Pert, 1980; Moskowitz y Goodman, 1984; Fabian y

Ablaitner, 1995), no es descabellado sugerir que muy probablemente los efectos inhibitorios de los agonistas opioidérgicos tengan lugar en ellos.

Diversas evidencias apuntan a que el candidato más probable que media la inhibición opioidérgica de la preferencia innata por feromonas de macho es de hecho la amígdala posteromedial cortical. En primer lugar, lesiones de este núcleo amigdalino en ratas hembra eliminan la preferencia de las mismas por aproximarse a un compartimento habitado por un macho frente a otro que contiene un macho castrado (Romero *et al.*, 1990). Segundo, infusiones de β -endorfina en la amígdala de ratas macho normales o con una lesión de la división basolateral de la amígdala, eliminan específicamente las respuestas pre-copulatorias de las ratas macho, sin tener consecuencias sobre la cópula (McGregor y Herbert, 1992). Estos resultados sugieren, por un lado, que la β -endorfina (que como hemos visto en la Justificación, presenta una mayor afinidad por los receptores μ) regula las respuestas de aproximación hacia una pareja sexual afectando al procesado de la información quimiosensorial, en lugar de afectar a la cópula en sí. Por otro lado, los resultados de McGregor y Herbert (1992) también indican que la acción de los opioides tiene lugar en núcleos de la amígdala no incluidos en la división basolateral, y por lo tanto se trate muy probablemente de un efecto sobre la citada amígdala posteromedial cortical.

Por el contrario, el antagonista naloxona no produce un efecto significativo en la atracción innata por feromonas ni en la adquisición de preferencia condicionada de lugar. Nuestros resultados en conjunto están en concordancia con resultados previos en ratones macho (Landauer y Balster, 1982), ratas macho (McIntosh *et al.*, 1980), ratas hembra

(Wiesner y Moss, 1986; Acosta-Martinez y Etgen, 2002) y hámsteres hembra (Ostrowski *et al.*, 1979), todos ellos mostrando que la administración sistémica o intracerebroventricular de morfina o β -endorfina disminuye diversas medidas de comportamiento sexual, mientras que la administración de antagonistas opioidérgicos no suele tener consecuencias. Reseñamos de entre todos ellos, por su similitud con nuestro estudio, el trabajo de Landauer y Balster (1982b) que mostraba como la preferencia de los ratones macho por explorar un compartimento habitado por una hembra inaccesible es inhibida por la morfina pero no afectada por la naloxona.

Otros comportamientos dirigidos por señales químicas son también afectados por agonistas del receptor μ . Por ejemplo, la preferencia de ratas lactantes por olor de crías es eliminada por la morfina (Kinsley *et al.*, 1995), mientras que la exploración social en ratas adultas también se ve disminuida por un tratamiento similar (Van den Berg *et al.*, 1999). En conjunto, estos resultados sugieren que la modulación opioidérgica, muy probablemente en la amígdala vomeronasal, puede producir cambios en una gran variedad de comportamientos guiados por feromonas. De hecho, debemos tener en cuenta que los péptidos opioidérgicos modulan las respuestas de las neuronas corticales y estriatales inhibiendo las aferencias excitatorias a estas neuronas (Jiang y North, 1992; Giacchino *et al.*, 1998; Zhu y Pan, 2005). Por lo tanto, una explicación plausible a la inhibición de todos estos comportamientos guiados por feromonas por los agonistas opiáceos, incluyendo la abolición de la atracción innata por feromonas de macho, es una inhibición de las aferencias glutamatérgicas desde el bulbo

olfativo accesorio a la amígdala posteromedial cortical y/o de las aferencias glutamatérgicas de la amígdala al estriado ventral, donde la expresión de receptores opioidérgicos también es importante. Por otro lado, el bloqueo de los receptores opioidérgicos en estas sinapsis no alteraría la transmisión glutamatérgica, lo que explica que los antagonistas no afecten al comportamiento. Así pues, es tentador sugerir que los efectos que ejercen los agonistas del receptor μ en el comportamiento socio-sexual se deba en parte a un procesamiento defectuoso de las señales feromonales, al menos en los roedores macrosmáticos.

Efecto diferencial de los opiáceos en los comportamientos pre-copulatorios y la cópula

Nuestros resultados indican que el bloqueo farmacológico de los receptores de opiáceos no tiene consecuencias sobre la adquisición de preferencia de lugar condicionada por feromonas de macho. De esta manera, aunque los opiáceos participan en la adquisición de preferencia de lugar condicionada por la actividad sexual, como en el caso de ratas hembra, con la cópula (Paredes y Martínez, 2001) o la eyaculación en ratas macho (Agmo y Berenfeld, 1990), en el caso de las feromonas sexuales parece que no se requiere la activación de los receptores opiáceos para el establecimiento de una preferencia condicionada de lugar. Por tanto, la transmisión opioidérgica no es necesaria para asociar las feromonas sexuales con su localización espacial, aunque parezca crítica para la asociación de la cópula con el contexto.

El comportamiento sexual consta tanto de elementos pre-copulatorios, como las respuestas de solicitud de las hembras hacia el

macho (Blaustein y Erksine, 2002), como de elementos consumatorios, es decir, la cópula en sí. En hembras de ratón, los comportamientos pre-copulatorios que implican la investigación de las señales químicas del compañero, como la llevada a cabo en el sustrato que las contiene o la investigación de la zona anogenital del macho, son independientes del estado hormonal (Mossman y Drickamer, 1996; Moncho-Bogani *et al.*, 2004), mientras que la aparición de la cópula muestra un estricto control endocrino (Blaustein y Erksine, 2002; Moncho-Bogani *et al.*, 2004). Esto puede explicarse porque ambos tipos de respuesta son controladas por núcleos cerebrales distintos. De esta manera, mientras la búsqueda de las feromonas podría regirse por las proyecciones de la amígdala vomeronasal al estriado ventral (Novejarque, 2007, ver punto 4.3 y 4.4), la circuitería neural que controla la cópula incluye el hipotálamo ventromedial en hembras (Pfaff y Sakuma, 1979a, b) y el área preóptica en los machos (Paredes y Baum, 1997). Teniendo todo esto en cuenta, los efectos que se observan tras el tratamiento con drogas opioidérgicas deben depender del tipo de respuesta medido (pre-copulatoria o copulatoria) y del sitio específico de inyección, en el caso de las administraciones intracerebrales.

Opiáceos, feromonas sexuales y sabor dulce: los diferentes tipos de recompensas quimiosensoriales son procesados por circuitos neurales distintos

Los efectos de las drogas opioidérgicas en la ingesta de soluciones dulces se han estudiado minuciosamente, y por lo tanto tenemos a nuestra disposición una ingente cantidad de literatura acerca

de las propiedades inhibitorias de los antagonistas opiáceos en el consumo de sacarosa (ver, por ejemplo, Agmo *et al.*, 1995; Moles y Cooper, 1995). Nuestros resultados muestran que la naloxona elimina la preferencia por una solución azucarada frente a agua, mientras que el fentanilo carece de efecto, lo cual es consistente con evidencias previas. Por ejemplo, el tratamiento con naloxona inhibe la preferencia de las ratas por una solución de sacarosa independientemente de la duración del test, mientras que la morfina incrementa el consumo sólo tras una hora (Czirr y Reid, 1986). Así pues, en nuestros tests de quince minutos observamos el efecto inhibitorio de la naloxona pero no el posible efecto potenciador del fentanilo.

El área cerebral donde los opiáceos endógenos, y por lo tanto las drogas opioidérgicas, actúan para controlar la ingesta es con toda probabilidad el núcleo accumbens. En este núcleo los opiáceos no sólo controlan la ingesta, especialmente de grasas y azúcares (Kelley *et al.*, 2002), sino también las propiedades hedónicas del sabor dulce (Peciña y Berridge, 2005). Sin embargo, otros comportamientos dirigidos por el refuerzo como el comportamiento sexual (Pfaus y Gorzalka, 1987) y la atracción por feromonas (nuestros resultados) son inhibidos por los opiáceos. La explicación más sencilla para este fenómeno deriva del hecho que cada estímulo es procesado por distintos núcleos antes de llegar al estriado ventral, el lugar donde, supuestamente, se codifican las propiedades hedónicas de los estímulos.

Así, los estímulos gustativos, llegan al estriado ventral a través de múltiples vías redundantes, desde centros corticales y subcorticales. De hecho, el accumbens recibe proyecciones de las principales áreas

gustativas como la corteza insular/perirrinal, el núcleo del tracto solitario y el área parabraquial (Brog *et al.*, 1993). Por el contrario, un único camino directo une la amígdala vomeronasal con el estriado ventral (Novejarque, 2007). Como se argumentó más arriba, dado que la amígdala posteromedial cortical es muy rica en receptores μ , éstos pueden ejercer aquí un efecto inhibitorio neto en el refuerzo inducido por feromonas.

Por lo demás, el refuerzo relacionado con la alimentación y aquél relacionado con el sexo también difieren en la implicación de otros neurotransmisores. En este sentido, la reproducción cuando no hay suficiente alimento disponible supondría una gran desventaja, y por tanto existen mecanismos neurobiológicos para prevenir esta situación. Por ejemplo, un estado hipocalórico incrementa el NPY, que estimula la alimentación e inhibe el comportamiento sexual (Kalra *et al.*, 1988, Kalra y Kalra, 2004). Los opiáceos parecen funcionar de manera análoga a este péptido, incrementando las propiedades hedónicas de los alimentos e inhibiendo tanto la exploración de feromonas sexuales, comportamiento pre-copulatorio, como el comportamiento sexual *per se*. Sin ir más lejos, la dopamina muestra asimismo efectos dispares sobre el refuerzo mediado por alimentos y el comportamiento sexual (Agmo *et al.*, 1995; Paredes y Agmo, 2004). En un estudio relativamente reciente, Carelli y colaboradores (2000) muestran que existe selectividad de respuesta en las neuronas del accumbens hacia refuerzos naturales (comida y agua) y a drogas (en su caso, cocaína). Ellos proponen, basándose en a estos resultados, que los distintos refuerzos son codificados por poblaciones discretas de neuronas gracias a su especificidad de respuesta; es más,

sugieren que aquellas neuronas que responden selectivamente a la cocaína podrían ser las que codifican los refuerzos relacionados con el sexo. Futuros experimentos para testar esta hipótesis podrían dar lugar a resultados muy interesantes.

4.3 PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO Y LA SEROTONINA EN LA ATRACCIÓN INNATA POR FEROMONAS DE MACHO

4.3.1 Justificación

Como ya sabemos, existen claras evidencias en favor de un papel clave de las proyecciones amígdalo-estriatales para algunos procesos de refuerzo (Everitt *et al.*, 1989, 1991, 1999; Cador *et al.*, 1989). Sin embargo, estos estudios se han centrado específicamente en la importancia del núcleo basolateral de la amígdala, ignorando las masivas proyecciones estriatales desde los núcleos corticales amigdalinos -receptores de aferencias directas desde los bulbos olfativos principal y accesorio (posterolateral cortical, y posteromedial cortical, respectivamente)-, que terminan en una zona específica del estriado ventral que incluye el tubérculo olfativo medial y los islotes de Calleja antero-mediales (Novejarque, 2007; Úbeda-Bañón *et al.*, 2008). Esta zona del estriado ventral presenta marcadores específicos, como el receptor 5-HT_{2A} de serotonina (Mijnster *et al.*, 1997; Jansson *et al.*, 2001) y el óxido nítrico (Rodrigo *et al.*, 1994; Riedel *et al.*, 2002).

Así, en este cuarto capítulo exponemos los resultados relativos a los efectos de las drogas serotoninérgicas y nitrérgicas sobre la exploración preferente de feromonas masculinas en hembras de ratón. Como discutiremos a continuación, ambos neurotransmisores intervienen en los mecanismos del refuerzo de distintas recompensas

naturales y artificiales, y aparentemente lo hacen actuando a nivel del estriado ventral. La agrupación de ambos neurotransmisores en un único capítulo se ve apoyada por las influencias recíprocas que tienen lugar entre ambos sistemas (Segieth *et al.*, 2001; Chanrion *et al.*, 2007).

Sistema serotoninérgico

La serotonina (o 5-hidroxitriptamina) es un neurotransmisor monoaminérgico derivado del aminoácido esencial triptófano (Azmitia, 2001), cuyas principales neuronas productoras se encuentran en el mesencéfalo, fundamentalmente en los núcleos del rafe (Dahlström y Fuxe, 1964).

Estas neuronas proyectan, de manera similar a los axones noradrenérgicos del *locus coeruleus* (cursando en principio por el ya conocido tracto prosencefálico medial), a todo el neocórtex, el bulbo olfativo, hipotálamo, tálamo, septum y estriado (Harding *et al.*, 2004).

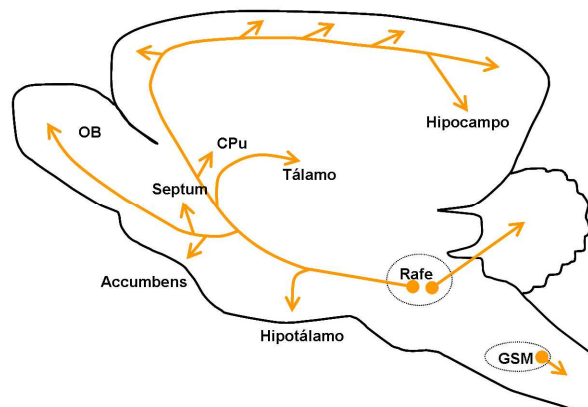


Figura 28. Esquema de los principales sistemas serotoninérgicos en el encéfalo del ratón. Abreviaturas: CPU: Caudatus Putamen; GSM: grupos serotoninérgicos medulares; OB; bulbo olfativo. (Adaptado de Sheperd; 1994).

Adicionalmente, una gran parte de las neuronas serotoninérgicas del rafe son además productoras de NO (Johnson y Ma, 1993).

Los receptores de serotonina se clasifican en siete familias (5-HT1 a 5-HT7), que comprenden a su vez hasta catorce subtipos (Barnes y Sharp, 1999), varios de los cuales se expresan en los núcleos de interés para nuestros objetivos. Así, el 5-HT2A, se encuentra tanto el bulbo olfativo como en el estriado ventral, incluyendo el núcleo accumbens, el tubérculo olfativo y los islotes de Calleja (Mijnster *et al.*, 1997; Barnes y Sharp, 1999; Jansson *et al.*, 2001), mientras que el receptor 5-HT2C, de estructura tan similar al anterior que muchos agonistas y antagonistas comparten afinidad por ambos (Hoyer *et al.*, 1994), se localiza en núcleo accumbens y amígdala (Barnes y Sharp, 1999). Finalmente, la distribución de los receptores 5-HT2B se restringe a unas pocas regiones en el SNC, entre las cuales se encuentra la amígdala medial (Duxon *et al.*, 1997).

Los sistemas serotoninérgicos participan en una amplia variedad de funciones, que van desde la regulación la presión sanguínea (Ramage, 2001), el balance homeostático (Heisler *et al.*, 2003) o la regulación de los ciclos de sueño (Saper *et al.*, 2001), hasta su implicación en comportamientos socio-sexuales, como la agresión (interaccionando con los sistemas nitrérgicos, Chiavegiatto y Nelson, 2003, ver más abajo) y el comportamiento sexual, donde sus efectos son inhibitorios o excitatorios dependiendo del núcleo considerado (Everitt *et al.*, 1974; Gonzalez *et al.*, 1997; Frohlich y Meston, 2000). Específicamente, algunos datos apoyan un papel de los receptores 5-HT2A en el comportamiento sexual, como la regulación de la expresión de estos receptores por estrógenos

(Summer y Fink, 1995), o la existencia de efectos facilitadores restringidos sobre algunos comportamientos proceptivos en hembras de rata (aunque no sobre la receptividad) (Nedergaard *et al.*, 2004; Rössler *et al.*, 2006).

Por último, la interacción entre la serotonina y la dopamina es clave para los efectos reforzantes de las drogas monoaminérgicas. Por ejemplo, la inducción de preferencia de lugar condicionada por cocaína tiene lugar tanto en animales deficientes para el transportador de la dopamina como en deficientes para el transportador de serotonina (Sora *et al.*, 1998), así como en los ratones deficientes para la dopamina (Hnsako *et al.*, 2007). Sin embargo, la cocaína es inefectiva para el condicionamiento de preferencia de lugar en ratones con una delección combinada de los genes para los transportadores de la dopamina y de la serotonina (Sora *et al.*, 2001).

Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es una pequeña molécula gaseosa, sintetizada a partir del aminoácido L-arginina por tres isoformas de una NO sintasa (NOS) de las cuales la eNOS (endotelial) y la nNOS (neuronal) se expresan de manera constitutiva, mientras que la tercera se ha denominado inducible (iNOS), puesto que sólo se produce en respuesta a estímulos inmunológicos, dando lugar a concentraciones citotóxicas de NO (Szabó, 1996). La activación de estas enzimas depende de Ca^{2+} /calmodulina, por lo que en el sistema nervioso la liberación de NO se encuentra estrechamente ligada a la función glutamatérgica, fundamentalmente a través su interacción en las especializaciones post-sinápticas con los receptores NMDA y sus canales de Ca^{2+} (Brenman y

Bredt, 1997). De hecho, su descubrimiento como neurotransmisor tuvo lugar sólo dos décadas atrás, al observarse que la activación de los receptores de glutamato tipo NMDA en un cultivo de neuronas granulares cerebelosas liberaba un factor con las mismas propiedades vasodilatadoras que el NO (Garthwaite *et al.*, 1988; Bredt *et al.*, 1990).

El mapeo de las neuronas productoras de NO se lleva a cabo fundamentalmente mediante la detección histoquímica de la actividad NADPH diaforasa, ya que las NOS utilizan el NADPH como coenzima (Dawson *et al.*, 1991; Hope *et al.*, 1991). Aún siendo atípico, este neurotransmisor se muestra ampliamente distribuido en todo el encéfalo.

Así, el NO actúa como mensajero en una gran variedad de procesos fisiológicos, entre los cuales se encuentran la vasodilatación (su función más famosa gracias al sildenafil, Boolell *et al.*, 1999) y el mantenimiento del flujo sanguíneo al cerebro, especialmente en áreas como la hipófisis y el cerebelo, y en menor medida en la corteza (Kovach *et al.*, 1992).

En el sistema nervioso central, el NO difunde rápidamente a través de las membranas celulares, debido a su pequeño tamaño y su carácter lipofílico, pudiendo actuar por tanto como mensajero anterógrado y retrógrado. Una vez dentro de la neurona, su principal segundo mensajero es una forma soluble de la enzima guanilato ciclasa (Ignarro, 1990). El hecho de que pueda atravesar las membranas hacen de él una molécula ideal para mediar procesos de plasticidad neuronal que requieren transformaciones actuar tanto a nivel post- como pre-sináptico, como la potenciación a largo plazo (*long term potentiation, LTP*) (Bohme *et al.*, 1993).

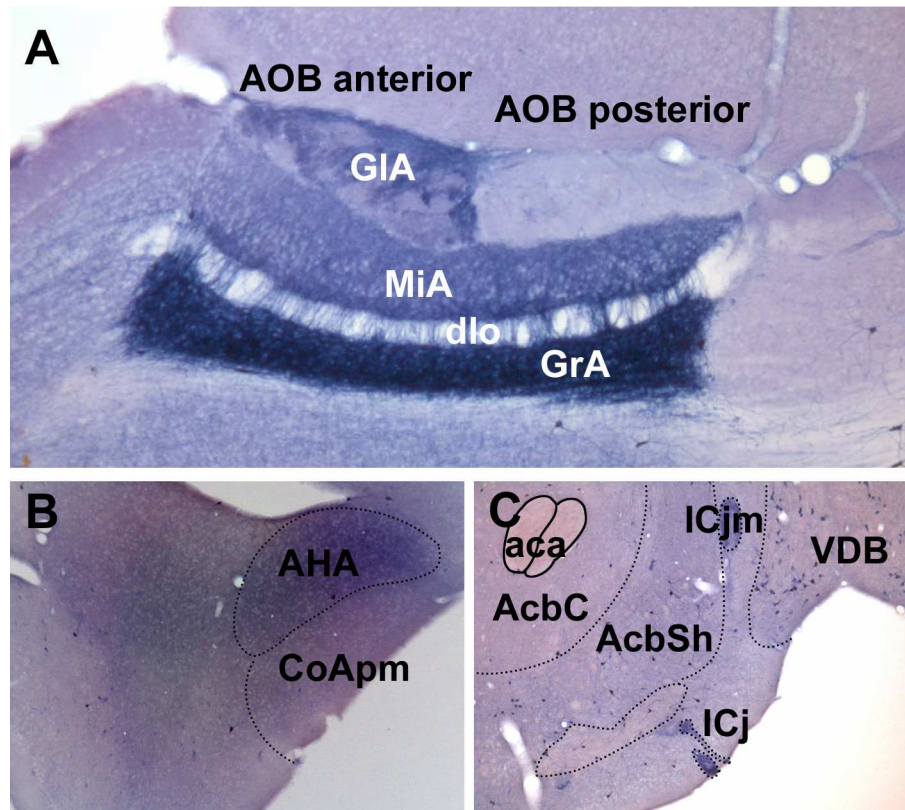


Figura 29. Detección histoquímica de la actividad NADPH diaforasa en diversos núcleos de la vía vomeronasal en el ratón.

A. Corte sagital del bulbo olfativo accesorio, donde se puede apreciar la gran reactividad en todas las capas, a excepción de los glomérulos de la porción posterior. B. Corte coronal mostrando los núcleos que conforman la amígdala vomeronasal. C. Corte coronal de una zona del estriado ventral a la cual llegan aferencias directas desde la amígdala vomeronasal (ver punto 4.4). Abreviaturas: aca: comisura anterior; AcbC: zona central o *core* del núcleo accumbens; AcbSh: zona periférica o *shell* del accumbens; AOB: bulbo olfativo accesorio; CoApm: amígdala posteromedial cortical; dlo: tracto olfativo dorsolateral; GIA: capa glomerular del bulbo olfativo accesorio; GrA: capa granular del bulbo olfativo accesorio; ICj: islote de Calleja; ICjm: islote de Calleja magno; MiA: capa mitral del bulbo olfativo accesorio; VDB: banda diagonal ventral. Imágenes cedidas amablemente por Joana Martínez-Ricós (A) y Amparo Novejarque (B y C).

De interés para nosotros es el hecho de que el NO sea esencial para el establecimiento de una gran variedad de procesos de aprendizaje asociado con estímulos olfativos, como por ejemplo el reconocimiento de los olores de las crías por parte de las ovejas (Kendrick *et al.*, 1997), la memoria de reconocimiento del compañero sexual que bloquea el efecto

Bruce en hembras de ratón (Okere *et al.*, 1996; Okere y Kaba, 2000), y el condicionamiento olfativo en crías de ratón (Samana y Boehm, 1999). Esto no resulta extraño si consideramos que la NOS se encuentra en gran abundancia en toda la vía de procesamiento de la información olfativa y vomeronasal, desde los bulbos olfativos hasta la amígdala, al menos en la rata (Rodrigo *et al.*, 1994) y en el ratón (observaciones realizadas sobre la colección de preparaciones de nuestro laboratorio, Figura 29).

Además, el NO es clave en la regulación de los comportamientos sociales, como indican las fuertes evidencias acerca de su implicación en la regulación de la agresión en roedores (Demas *et al.*, 1997; Demas *et al.*, 1999; Gammie y Nelson, 1999; Trainor *et al.*, 2007), donde como hemos visto anteriormente interacciona con la serotonina (Chiavegatto y Nelson, 2003). Asimismo, el NO participa en el control del comportamiento sexual, probablemente a nivel de hipotálamo mediante la regulación de la liberación de hormona luteinizante (Mani *et al.*, 1994).

Existen además algunas evidencias del papel del NO en ciertos procesos de refuerzo. Por ejemplo, experimentos con inhibidores de la NOS muestran la capacidad de estos fármacos para impedir el condicionamiento de preferencia de lugar inducido por diversas drogas de abuso (Itzhak y Martín, 2000; Li *et al.*, 2002; Manzanedo *et al.*, 2004; Sahraei *et al.*, 2004). Es más, los fármacos que promueven la actividad de esta vía, como el sildenafil, son capaces de inducir condicionamiento de preferencia de lugar por ellos mismos (Tahsili-Fahadan *et al.*, 2006). En cuanto al refuerzo inducido por sustancias naturales, los inhibidores de la NOS disminuyen la ingesta de líquidos *sabrosos*, como la leche (Morley *et al.*, 1995) o las soluciones de sacarina (Czech, 1999).

4.3.2 Grupos experimentales

Con este panorama en mente, en esta sección decidimos estudiar las implicaciones de la serotonina y el NO, dos neurotransmisores importantes en el estriado ventral y los islotes de Calleja, en la atracción incondicionada por feromonas de macho. Para ello, en primer lugar investigamos los efectos de un antagonista de los receptores de serotonina 5-HT₂, que presenta su mayor afinidad por los receptores del tipo 2A (Hoyer, 1994), así como de una agonista de 5HT-2 sobre la preferencia innata por feromonas de macho (Tabla 15). El tiempo entre la administración de la droga y el inicio del primer test comportamental fue de 30 minutos.

Experimento 3.A: Efecto de fármacos serotoninérgicos sobre la atracción innata por feromonas de macho	Fármaco	Dosis (mg/kg)	n
Experimento 3.A.1: Efecto del ketanserin	Salino		12
	Ketanserin Antagonista 5-HT ₂	0.5	8
		1	8
		2	10
Experimento 3.A.2: Efecto del DOI	Salino		15
	DOI Agonista 5-HT ₂	0.5	10
		1	10
		2	8

Tabla 15. Grupos experimentales utilizados para comprobar la implicación de la serotonina en la atracción innata por feromonas de macho en hembras de ratón.

A continuación, llevamos a cabo el mismo experimento, esta vez comprobando los efectos de un inhibidor general de la NOS, el L-NAME (N ω -Nitro-L-arginina metil ester hidrocloreto). El tiempo entre la administración de la droga y el primer test de comportamiento fue de 30 minutos (Tabla 16).

Experimento 3.B: Efecto del L-NAME sobre la atracción innata por feromonas de macho	Fármaco	Dosis (mg/kg)	n
	Salino		11
	L-NAME	50	8
	Análogo de la L-Arginina	100	11

Tabla 16. Grupos experimentales para estudiar la implicación del NO en la atracción innata por feromonas de macho.

Adicionalmente, debido a la distribución ubicua del NO en toda la vía olfativa/vomeronasal, analizamos el efecto de la administración de este fármaco, 30 minutos previo al test, sobre la capacidad de las hembras de discriminar orina de macho mediante el ya conocido test de habituación-deshabitación (Tabla 17).

Experimento 3.C: Efecto del L-NAME sobre la discriminación de orina de macho	Fármaco	Dosis (mg/kg)	n
	Salino		11
	L-NAME	100	11
	Análogo de la L-Arginina		

Tabla 17. Grupos experimentales para investigar el efecto del inhibidor de la NOS sobre la discriminación sensorial de la orina de macho.

4.3.3 Resultados

Experimento 3.A: Efecto de fármacos serotoninérgicos sobre la atracción innata por feromonas de macho

Experimento 3.A.1: Efecto del ketanserin

El ketanserin disminuyó de manera significativa la movilidad de los animales en los grupos tratados con las dosis más altas (Figura 30A) (ANOVA: $F_{3,34}=3.675$, $p=0.021$; post-hoc de Dunnet: Ket 0.5 mg/kg, $p=0.809$; Ket 1 mg/kg, $p=0.021$; Ket 2 mg/kg, $p=0.043$). La observación directa de los animales tratados con estas dosis altas constató que mostraban signos de sedación (ver Reimann, 1986), por lo que decidimos analizar medidas adicionales sobre su locomoción para comprobar estadísticamente esta posibilidad (Tabla 18). Los ANOVAs comparando estas medidas revelaron que tanto el tiempo que pasaban los animales inmóviles ($F_{3,34}=5.149$, $p=0.005$) como su velocidad media ($F_{3,34}=5.922$, $p=0.002$) y máxima ($F_{3,34}=4.779$, $p=0.007$), diferían significativamente entre grupos. Los p-valores para el análisis post-hoc de Dunnet, especificados en la Tabla 18, mostraron que efectivamente el efecto se debía a las dosis altas de ketanserin. Así, los animales tratados con la dosis de 2 mg/kg fueron diferentes del Salino en todas ellas, mientras que la dosis de 1 mg/kg afectó de manera marginalmente significativa a la velocidad máxima y redujo de manera significativa la velocidad media.

GRUPO EXPERIMENTAL	Tiempo de inmovilidad (s) M±E.t.	Velocidad máxima (cm/s) M±E.t.	Velocidad media (cm/s) M±E.t.
Salino	267.08±13.23	55.79±1.75	9.98±0.55
Ket 0.5 mg/kg	228.63±8.81, p=0.372	52.28±0.91, p=0.416	9.86±0.30, p=0.998
Ket 1 mg/kg	300.25±23.17, p=0.491	49.74±1.90, p=0.069	7.18±0.75, p=0.012*
Ket 2 mg/kg	332.70±25.99, p=0.038*	46.88±2.23, p=0.002**	7.19±0.82, p=0.007**

Tabla 18. Medidas adicionales de movilidad de los animales en el experimento explorando los efectos del ketanserin sobre la atracción innata por feromonas.

Los p-valores mostrados corresponden a las comparaciones post-hoc de Dunnett con el grupo Salino.

Por otra parte, el tiempo total empleado en las zonas que contenían los botes con viruta de hembra en el *control post-tratamiento* no fue significativamente distinto entre grupos (ANOVA, $F_{3, 34}=2.366$, $p=0.088$) (Figura 30B).

Los datos referentes al tiempo de exploración de cada lado en el *control post-tratamiento* y el *test de preferencia por feromonas de macho*, a pesar de cumplir la condición de normalidad, no cumplían las condiciones necesarias para aplicar un ANOVA de medidas repetidas (igualdad de las matrices de covarianzas e igualdad de las varianzas de error), de manera que aplicamos una prueba t de Student para medidas relacionadas. Este análisis reveló que los animales no mostraron preferencia previa por ninguno de los lados de la caja en el control post-tratamiento (Salino, $p=0.433$; Ket 0.5 mg/kg, $p=0.481$, Ket 2 mg/kg, $p=0.889$), excepto en el caso del grupo tratado con Ket 1 mg/kg, en el cual los sujetos pasaron más tiempo en el lado izquierdo ($p=0.018$). Este resultado es difícil de interpretar, puesto que en general como hemos visto a lo largo de la tesis, cuando ambos lados de la caja contienen estímulos idénticos se observa una exploración equilibrada. En cualquier caso, la preferencia por feromonas de macho sólo se vio afectada en los grupos tratados con

las dosis mayores (Figura 30C), es decir, aquéllos que presentaban una mayor afectación en su comportamiento (Ket 1 mg/kg, $p=0.742$; Ket 2 mg/kg, $p=0.214$), pero no en los animales tratados con la dosis más baja (Ket 0.5 mg/kg, $p=0.004$) ni en el grupo Salino ($p=0.001$). Por lo tanto, los efectos del ketanserin sobre la preferencia por feromonas de macho a las dosis analizadas no pueden desligarse totalmente de los efectos sedativos del fármaco, que deterioraron significativamente el comportamiento general.

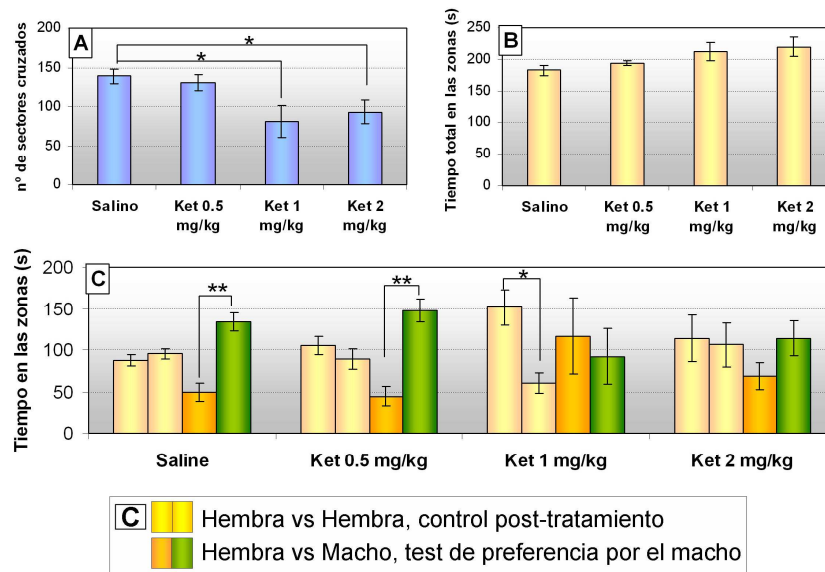


Figura 30. Efecto del ketanserin sobre la atracción innata por feromonas de macho.
 A. Locomoción; suma de los sectores cruzados en el control post-tratamiento y el test de preferencia por las feromonas de macho. B. Tiempo total en las zonas; suma del tiempo en ambas zonas en el control post-tratamiento. C. Tiempo en las zonas; tiempo en cada zona en el control post-tratamiento y el test de preferencia por feromonas de macho. $*=p<0.05$; $**=p<0.01$

Experimento 3.A.2: Efecto del DOI

El agonista de los receptores 5-HT₂ de serotonina no afectó de manera significativa ni a la movilidad (ANOVA, $F_{3,39}=1.873$, $p=0.150$)

ni al tiempo total empleado en las zonas en el control post-tratamiento (ANOVA, $F_{3,39}=2.258$, $p=0.097$) (Figura 31A,B).

Por lo que respecta a la preferencia por feromonas de macho, el ANOVA para medidas repetidas reveló efectos significativos de las interacciones TEST x LADO ($F_{1,39}=13.225$, $p=0.001$) y TEST x GRUPO ($F_{3,39}=4.385$, $p=0.009$), así como del factor LADO ($F_{1,39}=28.232$, $p<0.001$). Por otro lado, la interacción de tercer orden TEST x LADO x GRUPO fue marginalmente significativa ($F_{3,39}=2.461$, $p=0.077$), así como el factor TEST ($F_{1,39}=3.226$, $p=0.080$), mientras que no lo fueron ni la interacción del LADO x GRUPO ($F_{3,39}=0.046$, $p=0.987$) ni el factor GRUPO ($F_{3,39}=0.993$, $p=0.406$). Las comparaciones por parejas entre cada LADO en cada TEST y GRUPO revelaron que no existían diferencias significativas entre el tiempo que pasaban los animales en las zonas conteniendo viruta ensuciada por hembras en el *control post-tratamiento* (Salino, $p=0.896$; DOI 0.5 mg/kg, $p=0.987$; DOI 1 mg/kg, $p=0.543$), aunque en el grupo tratado con la dosis más alta del agonista se produjo una desviación hacia el lado derecho que resultó marginalmente significativa (DOI 2 mg/kg, $p=0.054$). Por otro lado, todos los grupos excepto el tratado con esta dosis más elevada mostraron preferencia por el lado que contenía la viruta de macho en el test de preferencia (Salino, $p<0.001$; DOI 0.5 mg/kg, $p=0.001$; DOI 1 mg/kg, $p=0.003$; DOI 2 mg/kg, $p=0.254$). (Figura 31C). Así pues, la dosis más alta de esta droga eliminó la preferencia por feromonas de macho sin afectar de manera significativa a la locomoción ni al tiempo total en las zonas en el *control post-tratamiento*,

aunque en éste afectó de manera marginalmente significativa a la exploración equilibrada de las mismas.

Por último, analizamos el comportamiento de escarbar tal y como hicimos en los experimentos utilizando fármacos catecolaminérgicos. Estos datos presentaban una distribución normal, que permitía la aplicación de pruebas paramétricas, pero no cumplieron las condiciones para la utilización del ANOVA de medidas repetidas.

Por lo tanto, aplicamos un ANOVA a la suma del tiempo escarbando en ambos botes en el *control post-tratamiento*, que reveló diferencias significativas entre grupos ($F_{3,39}=6.326$, $p<0.001$). El post-hoc de Dunnet mostró que fueron las dosis más altas las que provocaron una reducción significativa del comportamiento de escarbar con respecto al Salino (DOI 1 mg/kg, $p=0.012$; DOI 2 mg/kg, $p=0.021$) (Figura 31D). A continuación, aplicamos una prueba t de Student al tiempo dedicado a escarbar ambas virutas en el *test de preferencia por feromonas de macho*. El análisis reveló que este tiempo escarbando fue significativamente diferente en los animales tratados con Salino ($p<0.001$), pero sólo marginalmente significativo en las dosis baja e intermedia ($p=0.059$ y $p=0.057$ respectivamente) y no significativo en la dosis alta ($p=0.158$) (Figura 31E). Por último, un ANOVA comparando el tiempo empleado en escarbar la viruta de macho reveló diferencias marginalmente significativas entre grupos ($F_{3,39}=2.615$, $p=0.065$), debidas, como mostró el subsiguiente test de Dunnet, a la reducción del tiempo escarbando con la dosis más alta de droga ($p=0.024$).

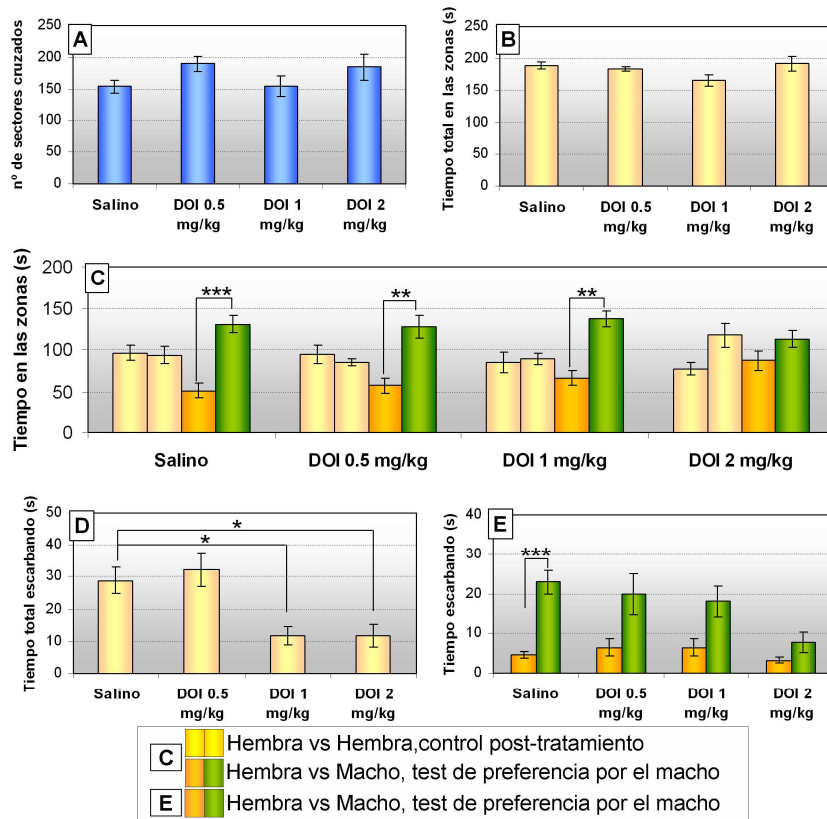


Figura 31. Efecto del DOI sobre la atracción innata por feromonas de macho y sobre el comportamiento de escarbar.

A. Locomoción; suma de los sectores cruzados en el control post-tratamiento y el test de preferencia por las feromonas de macho. B. Tiempo total en las zonas; suma del tiempo en ambos recipientes en el control post-tratamiento. C. Tiempo en las zonas; tiempo en cada recipiente en el control post-tratamiento y el test de preferencia por feromonas de macho. D. Tiempo total escarbando; suma del tiempo utilizado escarbando en ambos recipientes en el control post-tratamiento. E. Tiempo escarbando en cada recipiente en el test de preferencia por feromonas de macho. *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$

Experimento 3.B: Efecto del L-NAME sobre la atracción innata por feromonas de macho

El tratamiento con L-NAME no afectó ni a la movilidad de los animales (ANOVA entre grupos, $F_{2, 27}=1.082$, $p=0.353$) ni a la investigación total de las feromonas de hembra (ANOVA entre grupos, $F_{2, 27}=1.118$, $p=0.342$) (Figura 32A,B)

Con respecto a la preferencia por feromonas de macho, el ANOVA para medidas repetidas reveló una falta de interacción de tercer orden entre los factores LADO x TEST x GRUPO ($F_{2, 27}=1.972$, $p=0.159$). Tampoco resultó significativa la interacción entre TEST x GRUPO ($F_{2, 27}=0.344$, $p=0.712$), ni el efecto principal del factor GRUPO ($F_{2, 27}=0.612$, $p=0.550$). Por el contrario, la interacción entre los factores TEST x LADO ($F_{2, 27}=6.529$, $p=0.017$), y GRUPO x LADO ($F_{2, 27}=3.414$, $p=0.048$), así como de los factores LADO ($F_{1, 27}=14.692$, $p=0.001$) y TEST ($F_{1, 27}=13.662$, $p=0.001$) sí fueron significativos. Las comparaciones post-hoc por parejas entre cada LADO en cada TEST revelaron que el efecto del factor LADO tenía lugar en el *test de preferencia por feromonas de macho (control post-tratamiento)*, $p=0.365$; *test de preferencia por feromonas de macho*, $p=0.001$). Sin embargo, las comparaciones por parejas entre LADO en cada GRUPO mostraron una falta de efecto de las feromonas de macho en el grupo tratado con la dosis alta del fármaco (Salino, $p=0.003$; L-NAME 50 mg/kg, $p=0.005$; L-NAME 100 mg/kg, $p=0.883$). Como se aprecia en la Figura 32C, los animales de los dos primeros grupos exploraron significativamente más las feromonas de macho, cosa que no hicieron las hembras tratadas con la dosis más alta del inhibidor de la NOS.

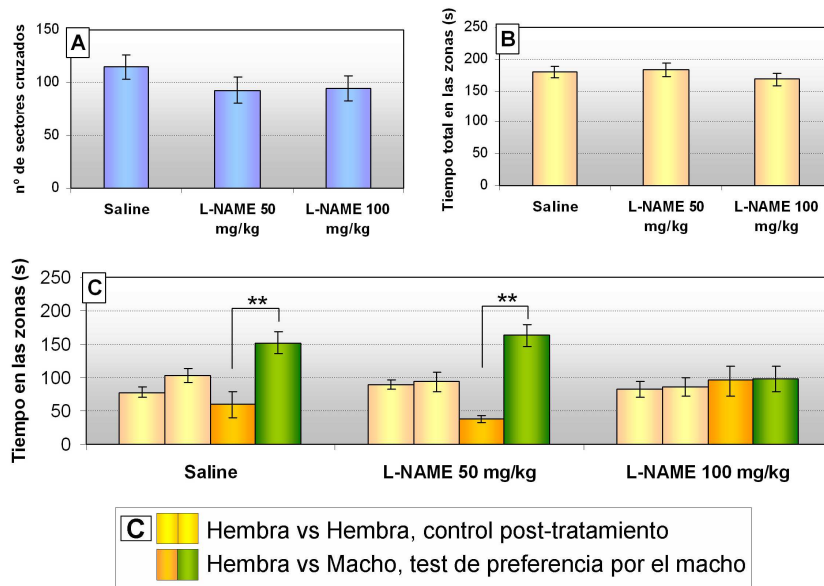


Figura 32. Efecto de un inhibidor de la NOS sobre la atracción innata por feromonas sexuales de macho.

A. Locomoción; suma de los sectores cruzados en el control post-tratamiento y el test de preferencia por las feromonas de macho. B. Tiempo total en las zonas; suma de la investigación de ambos recipientes en el control post-tratamiento. C. Tiempo en las zonas; tiempo cada zona en el control post-tratamiento y el test de preferencia por feromonas de macho. **= $p < 0.01$

Experimento 3.C: Efecto del L-NAME sobre la discriminación olfativa de orina de macho

Las hembras de ambos grupos detectaron la orina de macho, dado que la primera presentación del bastoncillo impregnado en este estímulo dio lugar a un incremento del olfateo del mismo (Figura 33).

Debido a la falta de normalidad de los datos, aplicamos un análisis no paramétrico de Wilcoxon comparando la última presentación del bastoncillo con agua con la primera del bastoncillo impregnado con orina. Este análisis mostró que tanto los animales del grupo Salino como los tratados con L-NAME fueron capaces de discriminar

olfativamente la orina de macho (Salino, $p=0.007$; L-NAME 100 mg/kg, $p=0.036$) (Figura 33). Sin embargo, como puede observarse en la Figura 33, el incremento provocado en el grupo tratado con el inhibidor de la NOS fue ligeramente menor, aunque la disminución en el tiempo investigando la primera presentación de la orina de macho sólo fue marginalmente significativa (Kruskal-Wallis comparando el tiempo olfateando el bastoncillo impregnado de orina en ambos grupos, $p=0.068$).

Por lo tanto, la pérdida de preferencia provocada por el tratamiento con la dosis más alta de L-NAME no puede explicarse por completo por una pérdida sensorial, dado que los animales tratados con esta droga son capaces de detectar la orina de macho casi tan bien como los tratados con salino.

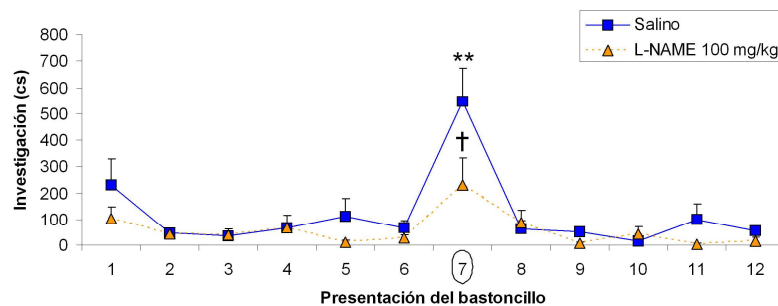


Figura 33. Efecto del antagonista de la NOS sobre la capacidad olfativa de detectar la orina de macho.

El círculo en el eje de abscisas señala el momento de la primera presentación de la orina de macho. **= $p<0.01$ en los animales del grupo salino. †= $p<0.05$ en los animales del grupo L-NAME 100 mg/kg.

4.3.4 Discusión

El tratamiento con un inhibidor general de la NOS eliminó de manera dependiente de dosis la preferencia innata de las hembras de ratón por las feromonas contenidas en la viruta ensuciada por machos, pero sin afectar de manera significativa a su capacidad para detectar la orina de éstos. Los resultados de los fármacos serotoninérgicos sobre la atracción innata por feromonas de macho no son concluyentes.

Efectos de los fármacos serotoninérgicos a lo largo de la vía vomeronasal

Tanto el agonista como el antagonista de los receptores 5-HT₂ de serotonina utilizados en nuestros experimentos inhibieron la preferencia por feromonas de macho de manera dependiente de dosis. No obstante, debemos tener en cuenta que mientras las dosis del antagonista que eliminaron la atracción mostraron severos efectos comportamentales, como una disminución drástica de la locomoción y signos visibles de sedación, los efectos del agonista fueron mucho más suaves a este respecto, afectando de manera significativa únicamente al comportamiento de escarbar. A continuación analizaremos los posibles efectos de las drogas sobre la vía vomeronasal.

En primer lugar, cabe señalar que existen cantidades significativas de serotonina en el órgano vomeronasal de ratones, que alcanzan sus mayores niveles en las hembras adultas si se comparan con los encontrados tanto en hembras prepuberales como en machos adultos (Zancanaro *et al.*, 1997). Esto sugiere que la serotonina podría tener un

papel en el mecanismo de bombeo vomeronasal, ya descrito para la inervación noradrenérgica (Meredith y O'Connell, 1979), o bien en la modulación de la sensibilidad a las feromonas de manera sexualmente dimórfica y dependiente de la edad. Sin embargo, dado que no se ha descrito la expresión de los tipos de receptores existentes en el órgano vomeronasal, desconocemos si los fármacos que utilizamos, específicos de los receptores 5-HT₂, podrían afectar a este nivel.

La serotonina podría asimismo modular el procesado en el bulbo olfativo accesorio, teniendo en cuenta la inervación serotoninérgica de las capas granular y la plexiforme interna del mismo (al contrario de lo que sucede en el bulbo olfativo principal, que recibe proyecciones serotoninérgicas masivas también a nivel de la capa glomerular) (Shipley *et al.*, 2004). En este sentido, se ha descrito que el tratamiento con ketanserin inhibe la activación, curiosamente, de la capa glomerular del bulbo accesorio, medida mediante la expresión de c-fos, de ratas hembras expuestas a orina de macho (Inamura y Kashiwayanagi, 2000). Nuestros resultados contrastan con este dato previo, puesto que los animales tratados con la dosis más baja de ketanserin muestran preferencia, y por lo tanto el bloqueo de los receptores no impide la función del bulbo olfativo accesorio.

Aunque no hemos encontrado datos que investiguen los efectos de la activación serotoninérgica en la amígdala posteromedial cortical, ni descripciones exhaustivas sobre la distribución de receptores serotoninérgicos, sí existen evidencias indirectas acerca de la expresión de receptores de tipo 5-HT_{2A} (Cyr *et al.*, 2000). Además, los datos disponibles muestran que la activación de los receptores 5-HT₂ en otro

de los núcleos paliales de la amígdala, el basolateral cortical, resulta tanto en una activación de las interneuronas GABAérgicas como en una hiperpolarización de las neuronas glutamatérgicas de proyección (Rainnie, 1999). Estos datos apuntan a que un desequilibrio en la activación de estos receptores podría dificultar el procesado de la señal feromonal en la amígdala posteromedial cortical, de manera similar a como sugerimos para el agonista de los receptores μ -opiáceos.

Por último, se ha demostrado que el DOI incrementa significativamente los niveles de dopamina en el estriado de la rata tras 30 minutos de infusión, medido mediante microdiálisis (Lucas y Spampinato, 2000). Teniendo en cuenta que el resultado de los experimentos utilizando anfetamina y el agonista de D1 fue análogo al encontrado con el DOI, tanto sobre la atracción innata como sobre el comportamiento de escarbar, podríamos incluso argumentar que el efecto de este último fármaco es consecuencia de los niveles incrementados de dopamina en el estriado provocados por el mismo.

No obstante, pese a la probabilidad de que la serotonina sea importante en el refuerzo inducido por feromonas atendiendo a la distribución anatómica de sus receptores, serán necesarios experimentos futuros para aclarar este punto.

Efecto del antagonista de NO a lo largo de la vía vomeronasal

La amplísima distribución de las neuronas nitrérgicas a lo largo de toda la vía vomeronasal (Rodrigo *et al.*, 1994; observaciones realizadas sobre la colección de preparaciones de nuestro laboratorio) hace que los

efectos observados puedan deberse a su acción sobre diversos núcleos implicados en este sistema.

El bulbo olfativo accesorio es una de las áreas con mayor expresión de NO del cerebro: la actividad NADPH diaforasa se encuentra a lo largo de toda la capa granular y mitral (Kishimoto *et al.*, 1993), aunque sólo en los glomérulos de la porción anterior (observaciones realizadas sobre la colección de preparaciones de nuestro laboratorio). Precisamente, la detección de las feromonas de macho resulta en una activación preferente, medida mediante la expresión de c-fos, de esta porción anterior en hembras de ratón (Moncho-Bogani *et al.*, 2002); resultado idéntico al que se encuentra en machos expuestos a viruta de hembras (Dudley y Moss, 1999).

La importancia del NO a nivel del bulbo olfativo accesorio se puede ilustrar mediante su participación en el *efecto Bruce*, que recordemos consiste en un fallo en la implantación de los embriones cuando las hembras de ratón son expuestas a feromonas de un macho extraño. Este efecto se ve bloqueado mediante el establecimiento de una memoria de las feromonas del compañero sexual (Bruce, 1959; Brennan *et al.*, 1990) que tiene lugar en el mismo bulbo olfativo accesorio y depende de la noradrenalina y el NO (Okere *et al.*, 1996). Aunque inyecciones sistémicas e intrabulbares de antagonistas de la NOS no impiden la formación de esta memoria olfativa (Brennan y Kishimoto, 1993; Okere *et al.*, 1995) -lo cual muestra que los antagonistas de la NOS no impiden la correcta función del bulbo olfativo accesorio- la sola infusión de un precursor del NO en el bulbo al exponer a las hembras a feromonas de macho sin que se produzca el apareamiento es capaz de bloquear el

efecto Bruce (Okere *et al.*, 1996). Además, los niveles de mRNA de NOS se incrementan en el bulbo olfativo accesorio durante la formación de esta memoria (Okere *et al.*, 2000).

Así pues, la inhibición farmacológica de la síntesis de óxido nítrico podría afectar a la detección de feromonas ya en la primera estación de relevo de la información vomeronasal. Sin embargo, como hemos visto, las hembras tratadas con la dosis de L-NAME que inhibe la preferencia sí se muestran capaces en cambio de discriminar la orina de macho en un test estándar de función olfativa, aunque con tiempos de exploración ligeramente inferiores a los de los animales control. Este resultado, muy similar al que arroja un estudio en machos utilizando un inhibidor específico de la nNOS (Trainor *et al.*, 2007), muestra que las hembras no padecen un déficit sensorial olfativo severo, y aunque basándonos en esta prueba no podemos descartar un déficit vomeronasal, ya que las hembras podrían simplemente discriminar los volátiles sin actividad feromonal que emanan de la misma (Martínez-Ricós *et al.*, *in press*), la sensibilidad a la droga no tendría por qué ser mayor en el bulbo olfativo accesorio que en el principal. De hecho, hasta donde nosotros sabemos, no existen evidencias de que el bloqueo de la transmisión nitrérgica pueda provocar anosmia por su acción a nivel del bulbo. De todas formas, según la distribución anatómica de las neuronas productoras de NO y de su diana, la guanilato ciclasa (Crespo *et al.*, 2003; Gutiérrez-Mecinas *et al.*, 2005) es muy probable la participación del NO en el procesado de la información olfativa (Breer y Shepherd, 1993). Hasta la fecha, estudios funcionales exhaustivos a este respecto se

restringen a invertebrados (Gelperin, 1994; Gelperin *et al.*, 2000; Collmann *et al.*, 2004).

En cuanto a la expresión de NADPH diaforasa en la amígdala, encontramos niveles masivos en la porción medial, que proyecta principalmente a los núcleos hipotalámicos que controlan tanto los comportamientos sexuales como los agonísticos (Newman, 1999; Choi *et al.*, 2005). La importancia de este circuito en los comportamientos y consecuencias neuroendocrinas inducidos por feromonas se referirá en el siguiente punto. Finalmente, se detectan escasas fibras reactivas en la amígdala posteromedial cortical y área amígdalo-hipocámpica, pero donde la expresión es realmente máxima es sin duda en una de sus zonas de proyección, los islotes de Calleja (Figura 29). La actuación de las neuronas nitrérgicas de estas estructuras debe ser clave para la expresión de la preferencia por feromonas de macho, como podremos comprobar en la sección 4.4.

El NO en la red neural que controla los comportamientos socio-sexuales

A lo largo de la tesis hemos apuntado la importancia de las señales feromonales no sólo en el comportamiento sexual, sino en el comportamiento social general de los roedores, incluyendo el comportamiento agonístico o el parental (ver punto 1.2 y punto 4.2.4).

De esta manera, aunque estos comportamientos suelen estudiarse por separado, su expresión implica vías neurales fuertemente solapantes que comprenden las porciones olfativas y vomeronasales de la amígdala (Newman, 1999, Veening *et al.*, 2005; Figura 34). Aquí,

neurotransmisores como el NO y la serotonina y hormonas esteroideas están actuando para coordinar la expresión de los diversos comportamientos.

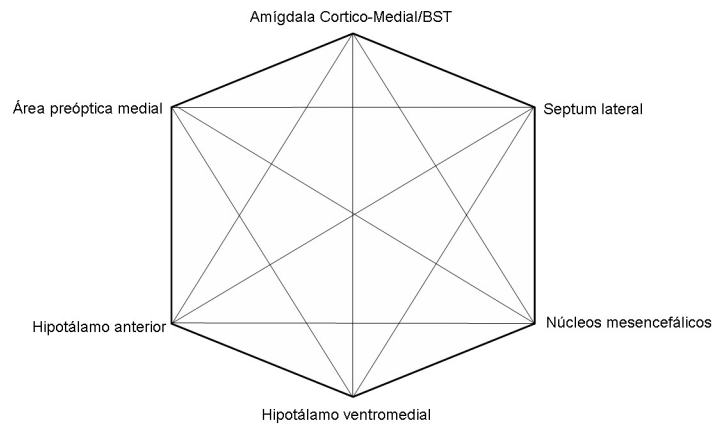


Figura 34. La red de los comportamientos socio-sexuales.

Adaptado de la propuesta de Newman (1999). Los núcleos se encuentran interconectados entre sí, poseen neuronas sensibles a esteroides y han sido implicados en la regulación de más de un comportamiento social. Los núcleos hipotalámicos incluyen el área preóptica medial, el núcleo ventromedial hipotalámico y el hipotálamo anterior. Los núcleos mesencefálicos incluyen el área gris periacueductal y los núcleos tegmentales. Abreviaturas: BST: núcleo del lecho de la *stria terminalis* (*bed nucleus of the stria terminalis*).

Específicamente, la transmisión nitrérgica es muy importante para la modulación de los comportamientos agonísticos. Así, tanto machos de ratón *knock-out* para la nNOS (Nelson *et al.*, 1995) como machos tratados con un inhibidor específico de esta isoforma (Demas *et al.*, 1997; Trainor *et al.*, 2007) muestran niveles exagerados de agresividad, mientras los *knock-out* para la eNOS expresan una agresividad reducida (Demas *et al.*, 1999). Por el contrario, las hembras de ratón, que en condiciones normales no son agresivas, no muestran cambios en este patrón de comportamiento ante una delección del gen nNOS (Nelson *et*

al., 1995), pero la agresividad maternal disminuye en estas mutantes (Gammie y Nelson, 1999).

Es más, la interacción del NO con otras moléculas importantes para estos comportamientos le permiten actuar como coordinador de los mismos. Por una parte, la testosterona, que promueve la agresividad (Brain y Bowden, 1979), inhibe la actividad de la NOS (Singh *et al.*, 2000), mientras los estrógenos incrementan su producción (Weiner *et al.*, 1994). Por otra, la serotonina, inhibitoria para los comportamientos agresivos (Miczek *et al.*, 1989; Muehlenkamp *et al.*, 1994; Ferris *et al.*, 1999) interacciona recíprocamente con el NO (Chanrion *et al.*, 2007), de manera que los mencionados *knock-out* para la nNOS muestran una reducción en el metabolismo de la serotonina (Chiavegatto *et al.*, 2001), responsable, según los autores del mencionado estudio, de los elevados niveles de agresividad de estos animales. Así, un trabajo posterior de este mismo grupo (Trainor *et al.*, 2007, ver más abajo), propone un esquema neuroquímico según el cual el NO producido por la nNOS promovería la investigación social por un lado, mientras por otro inhibiría la agresividad activando la función serotoninérgica.

En este contexto, dos puntos llaman especialmente la atención. En primer lugar, tanto los animales deficientes en las diversas isoformas de la NOS como los tratados con antagonistas de estas enzimas muestran déficits en otros comportamientos guiados por feromonas. Por ejemplo, los machos *knock-out* para la nNOS, aunque no las hembras, muestran un comportamiento sexual anómalo que se expresa como intentos de monta persistente de hembras no receptivas (Nelson *et al.*, 1995). Podemos intentar explicar esta observación mediante el análisis de

la ontogenia del comportamiento sexual de los machos. Los jóvenes vírgenes se muestran incapaces de discriminar el olor de las hembras en estro del de aquellas que no lo están, intentando por tanto copular de manera indiscriminada con cualquier hembra; un aprendizaje asociativo entre la cópula y el olor característico de las hembras receptivas permite que los machos con experiencia sexual sólo intenten copular con éstas (Agmo, 1999; ver Figura 1). Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente acerca del papel del NO en el aprendizaje, también podría resultar imprescindible para el establecimiento de éste. Además, los machos tratados con un antagonista específico de la nNOS son excesivamente agresivos y muestran una disminución significativa en la investigación social de un congénere presentado tras una barrera, así como una atenuación de la investigación de orina de macho en un test de habituación-deshabituación (Trainor *et al.*, 2007), similar a la que obtuvimos en nuestro experimento (ver Figura 33, página 151).

En segundo lugar, es muy llamativa la semejanza entre el fenotipo comportamental de animales deficientes en diversos receptores y proteínas asociadas expresados por las neuronas sensoriales vomeronasales y el que presentan los mutantes de la NOS. Por ejemplo, machos *knock-out* para el canal TRP2, que participa en la transducción de la señal en el órgano vomeronasal (Liman *et al.*, 1999), muestran comportamiento sexual por defecto, es decir, tratan de montar a cualquier congénere independientemente de su sexo, de manera que carecen de la respuesta de agresividad hacia otros machos (Leypold *et al.*, 2002; Stowers *et al.*, 2002). Por el contrario, ratones macho *knock-out* para un conjunto de receptores del tipo V1R (que se expresa en las neuronas

receptoras que proyectan a la porción rostral del bulbo olfativo accesorio, la que se activa frente a estímulos provenientes de congéneres del sexo opuesto según diversos estudios utilizando el marcador de actividad neural c-fos, ver arriba) muestran déficits tales como una reducción de su actividad sexual con la experiencia, al contrario del incremento que sucede en los silvestres (ver Introducción General). La agresividad en estos machos no se encuentra afectada, mientras que las hembras sufren una reducción de la agresividad maternal (Del Punta *et al.*, 2002).

Teniendo en cuenta estas observaciones, desde nuestro punto de vista se hace imprescindible analizar con una mayor profundidad la respuesta específica a las señales feromonales para comprender totalmente los estudios sobre comportamientos socio-sexuales, utilizando experimentos como los expuestos en la presente tesis doctoral. De esta manera, los patrones de comportamiento socio-sexual de los animales tratados con antagonistas de las NOS podrían explicarse basándonos en las acciones del NO en los núcleos encargados del procesado de la información vomeronasal, descartando otras señales sociales como las visuales o las auditivas que se encuentran presentes en los experimentos que utilizan al animal entero.

Por último, existe una abundantísima literatura acerca de la regulación neuroendocrina de los comportamientos socio-sexuales, centrándose por tanto en la amígdala medial, con su conspicua población de neuronas sensibles a esteroides y sus proyecciones al hipotálamo. Sin embargo, como ya sabemos, en hembras de ratón la investigación de las señales químicas provenientes de machos es independiente de su estado

hormonal (Mossman y Drickamer, 1996; Moncho-Bogani *et al.*, 2004). Por lo tanto es muy probable que los núcleos responsables del control de estos comportamientos posean una menor densidad de neuronas sensibles a esteroides. Este argumento nos lleva de nuevo a la amígdala posteromedial cortical como estructura que recibe información vomeronasal directa y posee niveles bajos a moderados de receptores α y β estrogénicos, en oposición a los niveles muy elevados que se expresan en la amígdala medial (Mitra *et al.*, 2003). Como hemos comentado, los niveles del marcador de actividad nitrérgica, NADPH diaforasa, no son demasiado elevados en esta porción de la amígdala, pero sí lo son en sus áreas de proyección, los islotes de Calleja. Es plausible que las estructuras pobres en esteroides participen en la génesis de los diversos comportamientos sociales o efectos provocados por las feromonas en los animales impúberes, con bajos niveles de hormonas gonadales (como el efecto de inducción del estro o efecto Whitten), mediante el control del comportamiento de investigación de las mismas. Asimismo, podrían ser claves en el procesado de las propiedades hedónicas de las feromonas sexuales, que como la atracción innata, debe ser independiente del estado hormonal del animal.

Hemos llegado al final de los estudios farmacológicos que componen la presente tesis. En el punto siguiente, el último de la sección de Estudios Desarrollados, comprobaremos si realmente la vía neural directa que une el bulbo olfativo accesorio con el estriado ventral, a través de la amígdala vomeronasal, es la responsable del comportamiento

de la preferencia innata de las hembras de ratón por feromonas de macho.

4.4 LOS ISLOTES DE CALLEJA Y LA ATRACCIÓN INNATA POR FERMONAS DE MACHO

4.4.1 Justificación

Los resultados expuestos en los capítulos anteriores muestran como el comportamiento de atracción innata por feromonas sexuales puede ser modulado por algunos neurotransmisores que se encuentran en altas concentraciones en el estriado ventral, como la dopamina, los opiáceos y el óxido nítrico. No obstante, las diferencias entre la modulación farmacológica del refuerzo de feromonas y el de reforzantes naturales *clásicos* como la sacarosa sugieren que probablemente su valor reforzante depende de territorios diferentes del estriado ventral con características neuroquímicas distintas.

Sabiendo que la atracción innata por feromonas es independiente de la activación dopaminérgica de la vía tegmento-estriatal (Martínez-Hernández *et al.*, 2006), e incluso puede ser inhibida por la actividad dopaminérgica (punto 4.1), las vías más probables de acceso de los estímulos feromonales al sistema del refuerzo serían las proyecciones quimiosensoriales directas al estriado ventral.

En su estudio detallado de las proyecciones amigdalinas al estriado en el ratón, Novejarque (2007) ha demostrado que de entre las regiones de la amígdala que reciben la inervación directa de los bulbos olfativos accesorios (ver Figura 3, página 37), tan solo el núcleo posteromedial cortical proyecta sustancialmente al estriado ventral, tanto

directamente como indirectamente, a través del área amígdalo-hipocámpica. Esta proyección, que no había sido descrita anteriormente en ningún mamífero, existe también en la rata (Úbeda-Bañón *et al.*, 2008). Los resultados de estos estudios indican que la amígdala vomeronasal apenas proyecta al núcleo accumbens (en su porción central o *core*), pero da lugar a densas aferencias hacia los puentes celulares del estriado y los islotes de Calleja anteromediales, incluido el magno, que se extienden a las capas profundas del tubérculo adyacente.

Por lo tanto, la proyección de la amígdala posteromedial cortical a los islotes de Calleja ventromediales (incluido el magno) y a territorios adyacentes del estriado ventral podrían constituir el sustrato anatómico de los efectos reforzantes de las feromonas sexuales en los ratones. En este sentido, estas estructuras presentan características neuroquímicas peculiares dentro del estriado ventral que podrían explicar los efectos de las drogas sobre la atracción innata por feromonas sexuales. Nosotros nos centraremos específicamente en la organización y las características neuroquímicas de los islotes de Calleja.

En secciones coronales de telencéfalo del ratón, los islotes de Calleja se observan como agrupaciones de neuronas asociadas al tubérculo olfativo en un número y forma variable, mientras el denominado islote de Calleja magno presenta una posición concreta asociado a la interfaz entre el accumbens, el septum y la banda diagonal. No obstante, recientemente se ha demostrado que todos los islotes se encuentran interconectados entre sí, formando una estructura continua pero de forma irregular incluso entre hemisferios de mismo animal (de Vente *et al.*, 2001). Estas peculiares estructuras están formadas por

agrupaciones de pequeñas neuronas granulares, presumiblemente GABAérgicas (Krieger *et al.*, 1983), que se colocan formando una copa que rodea el centro formado por el neuropilo, sobre el que se encuentran las neuronas medianas y grandes, mayoritariamente colinérgicas, que extienden sus dendritas hacia esta región central (Fallon *et al.*, 1983) (Figura 35). Son estas neuronas medianas y grandes las que constituyen los elementos eferentes de los islotes (Fallon, 1983).

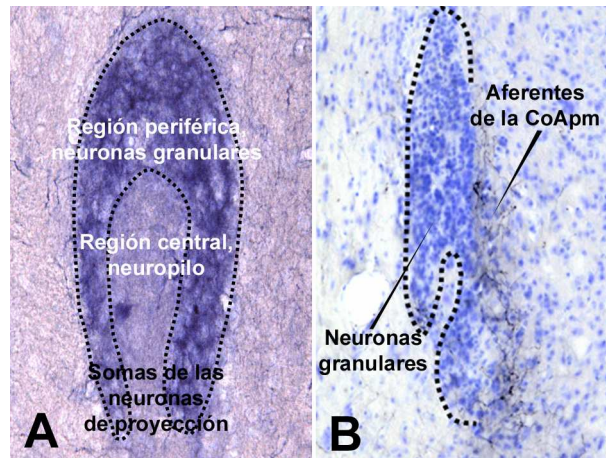


Figura 35. Citoarquitectura de los islotes de Calleja.

A. Detección histoquímica de la actividad NADPH diaforasa en el islote de Calleja magno, donde se distingue claramente la región periférica, con fibras fuertemente reactivas para esta actividad enzimática, y la región central, que contiene el neuropilo. Los somas de las neuronas colinérgicas se encuentran en la base de esta estructura, según Fallon *et al.*, 1983. B. Tinción de Nissl del islote de Calleja magno, mostrando las fibras marcadas anterógradamente en la región del neuropilo tras una inyección de un trazador neuroanatómico en la amígdala posteromedial cortical (CoApm). Imágenes cedidas amablemente por Amparo Novejarque.

La innervación por parte de los núcleos amigdalinos se distribuye de manera diferencial entre estos dos componentes neuronales. Así, mientras las proyecciones de la amígdala vomeronasal terminan específicamente en el neuropilo central de los islotes (Figura 35B), donde se extienden las dendritas de las neuronas de proyección (Fallon *et al.*,

1983), la amígdala basolateral inerva las interneuronas granulares (ver Fallon *et al.*, 1978).

En cuanto a las características neuroquímicas de estas agrupaciones, las neuronas granulares concentran una de las mayores poblaciones de receptores D3 (Diaz *et al.*, 1995), que colocaliza en la mayoría de los casos con el D1; estos receptores ejercen efectos opuestos (Ridrey *et al.*, 1998, ver Discusión General para la discusión de la conciliación de estos datos con los resultados del punto 4.1). Curiosamente, los islotes de Calleja carecen de receptores D2 (Landwehrmeyer *et al.*, 1993) y esta característica les hace ideales para estudiar la función de los receptores D3, menos conocida por el hecho de que los fármacos disponibles presentan afinidades considerables por el D2 (como es el caso del quinpirol), pero que parece fundamental en ciertos desórdenes psiquiátricos como la esquizofrenia y en los procesos de adicción (Joyce, 2001; Leriche *et al.*, 2004; Heidbreder *et al.*, 2005; Le Foll *et al.*, 2005).

Por otro lado, ciertos autores encuentran neuronas granulares reactivas para la NADPH diaforasa (Rodrigo *et al.*, 1994), pero una observación cuidadosa de las preparaciones de cerebro de ratón de la colección de nuestro laboratorio reveló que, si bien la zona granular es intensamente reactiva, la marca se debe fundamentalmente a una densa innervación (Figura 35A), probablemente por parte de las neuronas nitrérgicas del tubérculo olfativo y del *shell* del accumbens, aunque también desde algunas de las neuronas medianas de los propios islotes. Recordemos que el tratamiento con un inhibidor de la síntesis de NO eliminó la preferencia por feromonas de macho, por lo que existe la

posibilidad de que los islotes de Calleja sean uno de los lugares donde la acción de este neurotransmisor podría modular la atracción innata por feromonas.

Los islotes de Calleja son ricos asimismo en receptores 5-HT_{2A} (Minjster *et al.*, 1997; Jansson *et al.*, 2001), existiendo una falta de correspondencia entre los terminales axónicos serotoninérgicos y el marcaje inmunohistoquímico para estos receptores que sugiere que la transmisión serotoninérgica a este nivel sea de tipo volumétrico (Jansson *et al.*, 2001). Como vimos en el punto 4.3, los resultados para los fármacos serotoninérgicos no fueron concluyentes, dejando abierta la posibilidad de que la activación de estos receptores en los islotes de Calleja sea importante para el comportamiento que nos interesa.

Además, estas estructuras poseen los niveles más altos del receptor Y₁ del neuropéptido Y (NPY) en el cerebro del ratón (Gackenhaimer *et al.*, 2001), así como la mayor expresión de receptores m₄ de acetilcolina de todo el estriado de la rata (Wirtshafter y Osborn, 2004). Finalmente, los islotes de Calleja pueden sufrir influencias hormonales gracias a la inervación de fibras reactivas para el factor liberador de hormona luteinizante (LHRH) desde el septum (Fallon *et al.*, 1983), la expresión de receptores alfa estrogénicos, significativamente mayor que en el accumbens y el tubérculo olfativo (Mitra *et al.*, 2003), y la inervación vasopresinérgica (observaciones sobre la colección de preparaciones de nuestro laboratorio), influencias que se verían facilitadas por la gran vascularización que presentan (Meyer *et al.*, 1984).

4.4.2 Grupos experimentales

Considerando todos los datos precedentes, planteamos la hipótesis de que la atracción innata de las hembras de ratón por feromonas de macho dependa de las proyecciones de la amígdala vomeronasal a las zonas del tubérculo medial que comprenden los islotes de Calleja mediales y los puentes celulares. Esta hipótesis resulta especialmente atractiva puesto que la función de las estructuras mencionadas no se ha estudiado en profundidad. Por un lado, sí existen evidencias de la implicación del tubérculo olfativo en el refuerzo (Prado-Alcala y Wise, 1984; Kornetsky *et al.*, 1991; Ikemoto 2003, 2007; Ikemoto *et al.*, 2005), es más, recientemente se ha propuesto una revisión de la parcelación del mismo en base a los estudios funcionales (Ikemoto *et al.*, 2005). Sin embargo, la función de los islotes de Calleja es prácticamente desconocida.

Para investigar esta posibilidad, llevamos a cabo lesiones electrolíticas de la zona circundante al islote de Calleja magno en nuestras hembras de ratón químicamente vírgenes (grupo *Lesión*), para a continuación someterlas al *test de preferencia por feromonas de macho*. Se consideró importante comparar el comportamiento de estas hembras con el de dos grupos de control con el objetivo de conocer si el procedimiento quirúrgico afectaba a la preferencia. Así, el grupo *Control*, estaba constituido por hembras adultas sin ningún tratamiento, mientras que el un grupo *Falsa operación* se sometió a una cirugía de control, consistente en la trepanación del cráneo y la simple inserción de un electrodo (ver Material y Métodos) (Tabla 19).

Experimento 4. Efecto de lesión de la zona de proyección de la amígdala vomeronasal en el estriado ventral sobre la atracción innata por feromonas de macho	Grupo	
	Control	9
	Falsa operación	8
	Lesión	7

Tabla 19. Grupos experimentales y número de animales empleados para investigar los efectos de una lesión de la zona de proyección en el estriado ventral de la amígdala vomeronasal sobre la atracción innata por feromonas de macho.

4.4.3 Resultados

Experimento 4: Lesión de la zona de proyección de la amígdala vomeronasal en el estriado ventral

En la Figura 36 se muestran cortes histológicos representativos de los cerebros de los animales utilizados en el experimento, incluyendo dos animales sometidos a la *Falsa operación* (Figura 36A, B) y dos animales del grupo *Lesión*, representativos de una lesión muy restringida a la zona circundante al islote de Calleja magno (Figura 36C, D) y una lesión algo mayor, que afectó estructuras anejas como el tubérculo olfativo e incluso la zona central o *core* del accumbens (Figura 36E, F). Por otro lado, en la Figura 37 se muestran los dibujos correspondientes a dichos cortes histológicos, que muestran la citoarquitectura y resaltan la zona lesionada. La valoración de la inclusión de un animal en el grupo *Lesión* la llevó a cabo una persona que desconocía el tipo de operación sufrida por los animales (ver Material y Métodos).

En los animales del grupo *Lesión*, pero no en los que sufrieron la *falsa operación*, se hizo patente un incremento significativo de la locomoción (Figura 38A), como mostró un ANOVA ($F_{2, 21}=8.103$; $p=0.002$) seguido por un análisis post-hoc de Dunnett comparándolos con el grupo *Control* (*Falsa operación*, $p=0.321$; *Lesión*, $p=0.022$). Sin embargo, el tiempo total en las zonas de interés en el *control*, en el cual ambos recipientes contenían viruta usada por hembras, no resultó diferente entre los distintos grupos (ANOVA, $F_{2, 21}=1.339$; $p=0.284$) (Figura 38B).

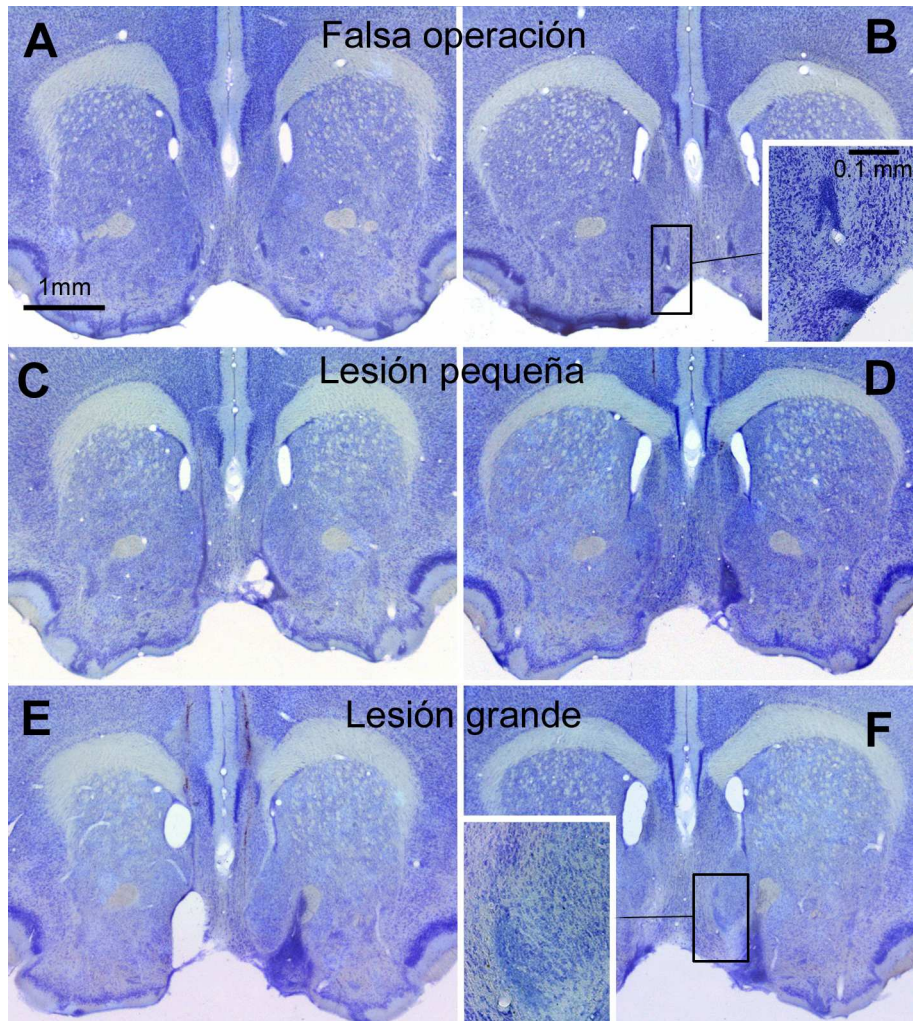


Figura 36. Cortes histológicos, teñidos con azul de toluidina, representativos de los cerebros de los animales utilizados para el experimento explorando el efecto de una lesión de la zona de proyección de la amígdala vomeronasal en el estriado ventral sobre la atracción innata por feromonas de macho.

A. Animal del grupo Falsa operación, mostrando esquemáticamente los límites de los núcleos del estriado ventral. B. Animal del grupo Falsa operación, con ampliación del islote de Calleja magno y un islote de Calleja antero-medial. C y D. Cortes representativos, rostral (C) y caudal (D) de un animal del grupo Lesión, con una lesión restringida a la zona circundante al islote de Calleja magno. E y F. Cortes representativos, rostral (E) y caudal (F) de un animal del grupo Lesión, con una lesión grande. Ampliación de la zona marcada F, donde se puede apreciar un resto de islote de Calleja magno.

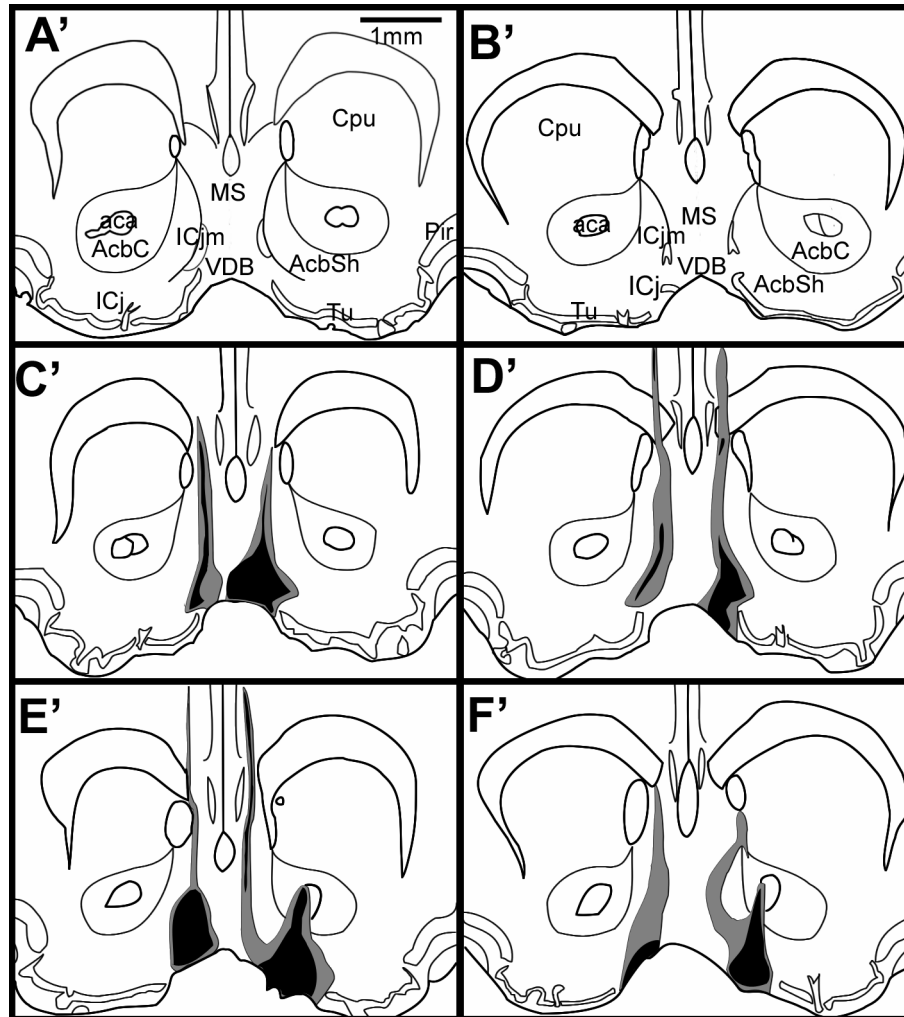


Figura 37. Dibujos de los cortes histológicos mostrados en la Figura 36 con un esquema de la citoarquitectura principal y la representación de la zona lesionada.

En negro, tejido necrosado, en gris tejido cicatrizado. A' y B' Cortes histológicos de dos animales del grupo Falsa operación, mostrando esquemáticamente los límites de los núcleos del estriado ventral. C' y D'. Cortes histológicos representativos, rostral (C') y caudal (D') de un animal del grupo Lesión, con una lesión restringida a la zona circundante al islote de Calleja magno. E' y F'. Cortes representativos, rostral (E') y caudal (F') de un animal del grupo Lesión, con una lesión grande. Abreviaturas: aca: comisura anterior; AcbC: *core* (zona central) del núcleo accumbens; AcbSh: *shell* (zona periférica) del núcleo accumbens; Cpu: caudatus putamen; ICj: islote de Calleja; ICjm: islote de Calleja, magno; MS: septum medial; Pir: corteza piriforme; Tu: tubérculo olfativo; VDB: banda diagonal ventral.

En cuanto a la preferencia innata por feromonas de macho, el ANOVA de medidas repetidas mostró efectos significativos de la interacción de tercer orden TEST x LADO x GRUPO ($F_{2, 21}=3.695$, $p=0.042$), de la interacción de segundo orden TEST x LADO ($F_{2, 21}=22.647$, $p<0.001$) y de los factores principales LADO ($F_{1, 21}=12.322$, $p=0.002$) y TEST ($F_{1, 21}=12.122$, $p=0.002$). Las interacciones LADO x GRUPO ($F_{2, 21}=2.191$, $p=0.137$) y TEST x GRUPO ($F_{2, 21}=0.695$, $p=0.510$), así como el factor principal GRUPO ($F_{2, 21}=1.145$, $p=0.337$) no fueron significativas. Las comparaciones por parejas de cada LADO en cada TEST y GRUPO revelaron que los animales no preferían a priori ninguno de los lados de la caja en el *control* (*Control*, $p=0.227$; *Falsa operación*, $p=0.471$; *Lesión*, $p=0.866$). Finalmente, tanto los animales del grupo *Control* como los que habían sido sometidos a una *Falsa operación* prefirieron de manera significativa el recipiente que contenía las feromonas de macho en el test de preferencia ($p=0.002$ y $p<0.001$ respectivamente), mientras que los animales del grupo *Lesión* no expresaron este comportamiento, no encontrándose diferencias significativas entre el tiempo en ambas zonas en este test ($p=0.608$) (Figura 38C).

Este resultado sugiere que la integridad de los islotes de Calleja es necesaria para la expresión comportamental de la preferencia innata por feromonas sexuales de macho en las hembras de ratón.

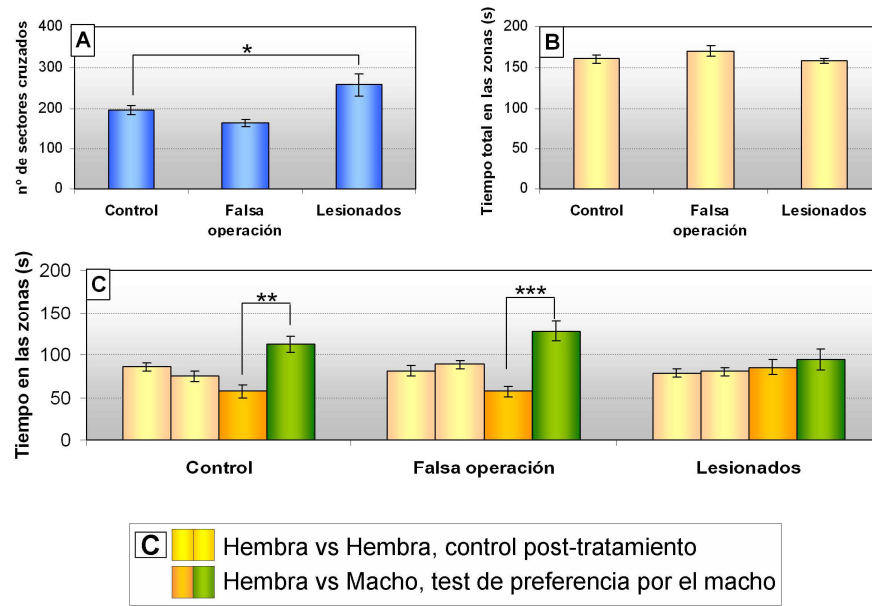


Figura 38. Efecto de una lesión de los islotes de Calleja magnos (y parte del estriado circundante) en la atracción innata por feromonas de macho. A. Locomoción; suma de los sectores cruzados en el control post-tratamiento y el test de preferencia por las feromonas de macho. B. Tiempo total en las zonas; suma del tiempo en ambas zonas en el control post-tratamiento. C. Tiempo en las zonas; tiempo en cada zona en el control post-tratamiento y el test de preferencia por feromonas de macho. *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$.

4.4.4 Discusión

Las lesiones electrolíticas de la zona circundante del islote de Calleja magno, que comprendían en todo caso lesiones bilaterales del mismo y de porciones variables del tubérculo medial y la banda diagonal ventral, dieron lugar a un aumento significativo en la distancia recorrida por los animales y eliminaron la preferencia innata de las hembras de ratón por feromonas de macho.

Hiperlocomoción en los animales lesionados

Los animales con una lesión de la zona circundante al islote de Calleja magno, además de no explorar preferentemente las feromonas de macho, mostraron un incremento significativo de la distancia recorrida al compararlos con los animales utilizados como control. Este efecto no se debía a una ansiedad basal más elevada en los animales sometidos a la cirugía, puesto que los que sufrieron una falsa operación no mostraron alteraciones en el comportamiento locomotor.

Una posible explicación de este efecto sobre la locomoción de la lesión sobre la locomoción podría basarse en las propiedades inhibitorias de los receptores D3, dado que las neuronas granulares de los islotes de Calleja se encuentran entre las estructuras con niveles más elevados de este receptor del telencéfalo (Diaz *et al.*, 1995). Varios estudios han demostrado que los ratones con una delección del gen del receptor D3 son hiperactivos (Accili *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1997); asimismo, ratas tratadas crónicamente con un oligonucleótido antisentido para el receptor D3 muestran igualmente un incremento de la locomoción (Menalled *et al.*, 1999). Es más, la detección por autorradiografía de los

receptores D3 de estas ratas tras el tratamiento demostró una disminución significativa de los mismos en los islotes de Calleja, pero no en el *shell* del accumbens ni en el estriado dorsal (Menalled *et al.*, 1999), sugiriendo que la hiperlocomoción se debía a una desinhibición provocada por la pérdida de los receptores en los islotes. A este respecto, se ha sugerido que el efecto locomotor observado tras una pérdida de los receptores D3 se debe en realidad a una alteración de la exploración del ambiente, al perderse las claves olfativas que en el estriado ventral convergen en el tubérculo olfativo y los islotes de Calleja (Xu *et al.*, 1997). Esta hipótesis es consistente con la posible función de los islotes de Calleja como estructuras implicadas en la valoración emocional de señales químicas, y explicaría tanto el incremento de la locomoción como la pérdida de atracción por las feromonas de macho en los animales lesionados.

La previamente discutida pero nunca demostrada función de los islotes de Calleja

A pesar de algunos intentos por describir la función de los islotes de Calleja basándose en estudios anatómicos (Fallon *et al.*, 1983; Meyer *et al.*, 1994; Ubeda-Bañon *et al.*, 2008), los estudios funcionales han sido extraordinariamente escasos. Es por ello que a día de hoy no existen evidencias concluyentes acerca de la función específica de los islotes de Calleja. No obstante, sí existen diversas hipótesis sobre este punto, que expondremos a continuación.

En primer lugar, la existencia de una población significativa de neuronas barorreceptoras (Calaresu *et al.*, 1994; McKritick *et al.*, 1992), y

el alto contenido en NO, con su función vasodilatadora, parecen sugerir una implicación de los islotes de Calleja en la regulación de la presión arterial (Calresu *et al.*, 1994). Otras investigaciones, sin embargo, revelan que la población de neuronas barorreceptoras es extremadamente baja (Kirouac y Pittman, 1999), contradiciendo esta hipótesis. Por otro lado, el estudio del patrón de vascularización de los islotes llevó a Meyer y colaboradores (1994) a sugerir que los islotes de Calleja constituían un punto de control de flujo sanguíneo al estriado/pálido. Nuevamente, otros autores han mostrado patrones de vascularización no consistentes con el descrito en el estudio de Meyer y colaboradores (de Vente *et al.*, 2001), poniendo en duda la validez de esta hipótesis. Por otro lado, otros experimentos sugieren que la activación de los receptores D3 de los islotes de Calleja pueden influir en la termorregulación de los animales (Barik y de Beaurepaire, 1998).

Existen, no obstante, hipótesis acerca de la función de los islotes de Calleja de mayor interés para nuestros objetivos. Basándose en las observaciones anatómicas anteriormente descritas, a saber, la inervación por parte de núcleos olfativos y vomeronasales, las aferencias LHRH positivas y la gran vascularización, Fallon y colaboradores (Fallon *et al.*, 1978, 1983; Fallon, 1983) proponen que los islotes de Calleja deben formar parte de un sistema corticoestriatopalidal endocrino que modularía eventos neuroendocrinos y motores en el contexto de la reproducción. En cierta concordancia con esta hipótesis, Talbot y colaboradores (1988) especularon acerca de la posibilidad de que los islotes de Calleja participen en el procesado cognitivo de los olores de carácter sexual, incluyendo la adquisición de la preferencia por el olor de

las hembras en estro o la potenciación de la capacidad excitadora de estos olores según el estatus hormonal de los individuos.

Los resultados anatómicos y farmacológicos expuestos en la presente tesis nos permiten apoyar la visión expuesta por los trabajos de Fallon y colaboradores (1983) y Talbot y colaboradores (1988) sobre la pertenencia de los islotes de Calleja a un circuito neural que controla los comportamientos desencadenados por feromonas y olores sexuales. En concreto, nuestros resultados muestran que el valor atractivo innato de las señales químicas que mediaría la aproximación hacia e investigación de posibles parejas sexuales, posibilitando así los subsiguientes procesos endocrinos y comportamentales asociados a ellas, depende de la integridad de estas estructuras. Es más, el hecho de que las neuronas colinérgicas de los islotes de Calleja concentren estrógenos (Fallon *et al.*, 1983) podría proporcionar a los islotes de Calleja la capacidad de actuar como un nexo de unión entre los comportamientos independientes del ciclo, como la atracción innata por feromonas de macho, y otros comportamientos que sí se encuentran bajo control hormonal.

Los islotes de Calleja y el comportamiento socio-sexual

Retomando la discusión acerca de la red neural que controla los comportamientos socio-sexuales que expusimos en el punto 4.3.4, podemos argumentar la pertenencia de los islotes de Calleja a dicho circuito basándonos tanto en la neuroquímica de estas estructuras como en su función en el comportamiento exploratorio de las feromonas. Así, no sólo los islotes de Calleja son ricos en actividad nitrérgica (ver Figura 35A, página 166) y serotonérgica (Minjster *et al.*, 1997; Jansson *et al.*, 2001), que como vimos en el punto 4.3 son críticas en la coordinación de

los comportamientos agonísticos, sino que expresan neuropéptidos cruciales en los comportamientos sociales.

En primer lugar, los islotes de Calleja reciben inervación vasopresinérgica, siendo ésta mucho más abundante en el caso de los machos (observaciones preliminares no publicadas realizadas en el laboratorio). Este dimorfismo sexual es idéntico al que existe en el septum lateral, donde la inervación vasopresinérgica, mayor en machos (de Vries *et al.*, 1981) procede de la amígdala medial y el núcleo del lecho de la *stria terminalis* (deVries *et al.*, 1985; Caffé *et al.*, 1987). La función de la inervación vasopresinérgica del septum lateral en el comportamiento social se ha estudiado en detalle, demostrándose importante para el comportamiento agonístico de los machos de ratón y de rata (Compaan *et al.*, 1993; Everts *et al.*, 1997), la memoria social, medida como la disminución de la investigación que llevan a cabo las ratas frente a individuos ya conocidos (Everts y Koolhaas, 1997, 1999), el comportamiento de marcaje en hámster (Irvin *et al.*, 1990), e incluso la organización social de ciertos animales. A este respecto, merece reseñarse el caso de dos especies de topillos, una monógama y profundamente social y otra formada por individuos promiscuos y solitarios; ambas especies difieren precisamente en sus patrones de expresión de vasopresina en el septum lateral (Insel *et al.*, 1994).

Si la vasopresina es importante en el comportamiento masculino, la oxitocina, que también se expresa en los islotes de Calleja (Snijdwint *et al.*, 1989) de forma dependiente de esteroides sexuales (Tribollet *et al.*, 1990), parece jugar un papel homólogo en las hembras. Por ejemplo, se ha visto que mientras el establecimiento de parejas estables en los

topillos monógamos macho depende de la vasopresina (Winslow *et al.*, 1993), en las hembras es dependiente de oxitocina (Insel y Hulihan, 1995). Es más, la oxitocina participa de la misma manera que la vasopresina en el reconocimiento social; de hecho ratones deficientes para este neuropéptido no son capaces de discriminar un animal conocido (Ferguson *et al.*, 2000), aunque la estructura en la cual es necesaria la oxitocina para este tipo de memoria es la amígdala medial (Ferguson *et al.*, 2001).

Además, los islotes de Calleja expresan los niveles del receptor Y1 más elevados en el cerebro del ratón (Gackenheimmer *et al.*, 2001). Curiosamente, machos de ratón *knock-out* para el receptor Y1 del NPY muestran incrementos significativos tanto en la agresividad territorial como en la investigación anogenital (Karl *et al.*, 2004), lo cual sugiere fuertemente la participación del NPY en la regulación de ambos comportamientos, probablemente mediante la actividad de las neuronas que expresan NPY en estructuras olfativas y/o vomeronasales. Entre estas estructuras, que controlan tanto la investigación de las señales químicas como participan en la agresión promovida por las mismas, deberá estudiarse con más detalle la inclusión de los islotes de Calleja. Adicionalmente, la inervación de fibras NPY de los islotes de Calleja podría dar lugar a un punto de control adicional en la coordinación del comportamiento ingestivo y la reproducción, regulados en direcciones opuestas por los niveles de NPY en el hipotálamo (Kalra *et al.*, 1988; Kalra y Kalra, 2004).

Así, los islotes de Calleja, que aglutinan neurotransmisores y neuropéptidos claves en diversos tipos de comportamiento social, y se

encuentran estrechamente interconectados tanto con la amígdala quimiosensorial, que procesa las señales químicas sociales de los congéneres, como con el septum que coordina los comportamientos sociales, se encuentran en una posición más que adecuada para formar parte del putativo *circuito social* propuesto por Newman (1999) (Figura 39).

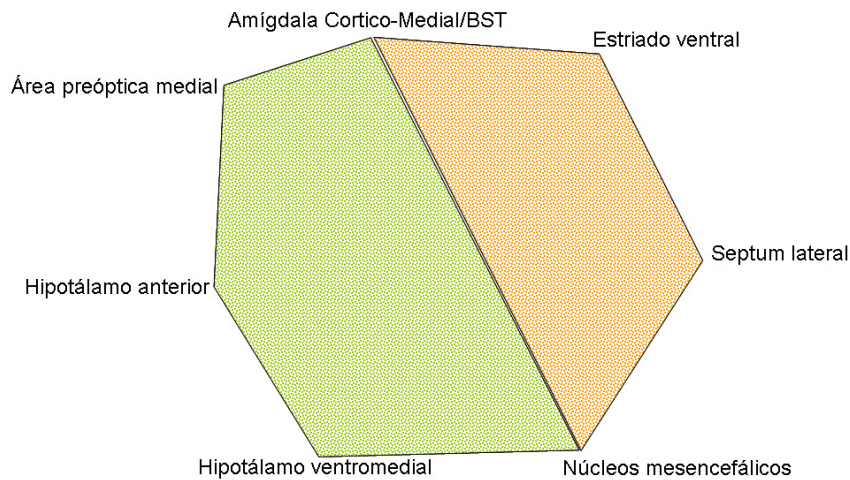


Figura 39. Ampliación de la red neural de los comportamientos socio-sexuales.

A la propuesta de Newmann (1999), se incluye la zona de proyección de la amígdala cortical en el estriado ventral. Los núcleos hipotalámicos deben controlar, mayoritariamente, las reacciones neuroendocrinas provocadas por las feromonas, mientras que el resto de núcleos pueden estar más implicados en las respuestas emocionales suscitadas por las feromonas.

Implicaciones de la inclusión de los islotes de Calleja en las vías del refuerzo de estímulos quimiosensoriales

La inclusión de los islotes de Calleja mediales en el circuito que controla la atracción innata por feromonas sexuales, y por lo tanto muy probablemente en los procesos de aprendizaje asociados, no sólo es de importancia para la comprensión de las vías neurales que controlan refuerzo inducido por feromonas, sino que puede proporcionarnos

nuevas vías de investigación acerca de los mecanismos de la adicción y de ciertas patologías que implican disfunciones en el comportamiento social.

Por lo que respecta a la adicción, los islotes de Calleja antero-mediales se encuentran en la zona del estriado ventromedial que se ha demostrado implicada en los efectos adictivos de las drogas de abuso en mayor medida que las porciones laterales (Ikemoto *et al.*, 2003; 2005; Ikemoto, 2007). Además, ciertas drogas de abuso como la cocaína (Young *et al.*, 1991), el MDMA (Stephenson *et al.*, 1999) o el cannabis (Arnold *et al.*, 2001) incrementan la actividad neuronal, medida mediante c-fos, tanto del accumbens como del islote de Calleja magno. Sin embargo, los estudios consultados se limitan a registrar las variaciones provocadas por las distintas drogas en los islotes de Calleja, pero sin discutir el posible significado funcional de estos hallazgos.

En el marco conceptual de un posible *sistema del refuerzo quimiosensorial*, que incluya las proyecciones desde la amígdala vomeronasal y olfativa a los islotes de Calleja (Novejarque, 2007; Úbeda-Bañón *et al.*, 2007), estas observaciones nos hacen pensar en la posibilidad de que la actuación de ciertas drogas de abuso a este nivel pudiera contribuir a sus efectos adictivos y/o comportamentales. Como ya apuntamos anteriormente, una idea similar fue propuesta por Carelli y colaboradores (2000) al observar que las neuronas del accumbens responden selectivamente bien a cocaína o bien a refuerzos naturales ingestivos; una de las explicaciones para esta selectividad es que la cocaína esté actuando sobre neuronas que responden a estímulos sexuales ya que es improbable que existan células especializadas en

responder a sustancias exógenas. En este sentido, la comprensión profunda de los circuitos neurales y los mecanismos neuroquímicos que controlan el refuerzo inducido por feromonas en ratones puede contribuir al conocimiento de los procesos de adicción.

Por otro lado, el hecho de que los islotes de Calleja se encuentren conservados en la mayoría de las especies de mamíferos (Meyer *et al.*, 1989), entre los cuales se encuentran animales que carecen de un sistema vomeronasal y en los que el olfato no es el sentido preponderante, como es el caso del hombre, abre una vía de investigación sobre la posibilidad de que continúen actuando de la misma manera como estructura clave en el comportamiento de búsqueda a un compañero sexual. No obstante, los estímulos olfativos no han perdido su capacidad para actuar como estímulos emocionales en el caso del ser humano, e incluso se han descrito reacciones endocrinas y afectivas mediadas por presuntas feromonas olfativas (Stern y McClintock, 1998; Jacob *et al.*, 2001; Wyart *et al.*, 2007).

Finalmente, y permitiéndonos ir un poco más allá en la especulación, nos resulta llamativo que algunos desórdenes psiquiátricos, como la esquizofrenia, se hayan relacionado con los receptores D3, ya que los fármacos antagonistas de estos receptores suelen ser muy eficientes para el tratamiento de esta enfermedad (Joyce *et al.*, 1999; Leriche *et al.*, 2004; Sokoloff *et al.*, 2006), pero se haya pasado por alto a las estructuras que aglutinan la mayor población de receptores de este tipo. Es muy interesante además que estos desórdenes vayan asociados a déficits en la función olfativa (Rupp, 2003), incluyendo la atribución de un significado emocional a diversos olores (Moberg *et al.*, 2003). Es más,

se ha llegado a proponer un nexo de unión entre los déficits sociales y los déficits olfativos en estos pacientes (Malaspina y Coleman, 2003). Estas ideas proporcionan un punto adicional de interés para continuar profundizando en el estudio de los islotes de Calleja como estructuras importantes para la selección de la respuesta apropiada frente a estímulos quimiosensoriales biológicamente significativos.

5. DISCUSIÓN GENERAL

La presente tesis doctoral analiza la base neuroquímica del valor reforzante para las hembras de ratón de las feromonas sexuales de macho de esta especie, valor que ha sido recientemente demostrado (Martínez-Ricós *et al.*, 2007). La estrategia que se ha seguido para conseguir este objetivo ha sido la administración sistémica de fármacos neuroactivos, acompañada por lesiones de los núcleos de interés, sobre la exploración de viruta ensuciada por machos, que contiene sus feromonas sexuales, en tests de preferencia de doble elección en los cuales éste estímulo se enfrentaba a viruta utilizada por hembras. Además, se ha explorado el efecto de ciertos fármacos antagonistas sobre la adquisición de una preferencia condicionada de lugar inducida utilizando feromonas de macho como recompensa.

Para la evaluación del alcance de los resultados es necesario discutir en primer lugar las virtudes y limitaciones de la metodología empleada. Hecho esto, intentaremos resumir de manera comprensiva los resultados obtenidos en los experimentos farmacológicos, e integrar estos datos en el circuito anatómico del refuerzo inducido por feromonas. Nuestros resultados también nos permiten comparar los mecanismos y vías del refuerzo de las feromonas sexuales con los de otros estímulos reforzantes naturales, lo cual nos llevará a discutir si existe un solo mecanismo para la codificación de las propiedades hedónicas que median el refuerzo primario o si por el contrario existen microcircuitos diferentes para cada recompensa.

Por último, discutiremos si la existencia de circuitos amígdalo-estriatales para la señalización del valor hedónico de las feromonas se restringe al ratón o si por el contrario constituye una característica general del cerebro de los tetrápodos. Como veremos, los estudios comparados realizados en el seno de nuestro grupo de investigación y de otros, sugieren que los islotes de Calleja y los territorios del estriado ventral adyacentes a los mismos son equivalentes al llamado *olfatoestriado* de los reptiles, en los cuales se ha comprobado también el valor reforzante de determinados estímulos vomeronasales (Kubie y Halpern, 1979; Halpern, 1988). Todo ello nos permite concluir discutiendo la posición de las vías amígdalo-estriatales en los dos sistemas funcionales entrelazados que constituyen la amígdala de los amniotas.

5.1 SOBRE LA METODOLOGÍA

5.1.1 El test de preferencia por feromonas de macho y el refuerzo

Como sabemos, las hembras de ratón *químicamente vírgenes* exploran de manera intensa y preferente la viruta utilizada por machos, que contiene sus feromonas, cuando se enfrenta a viruta ensuciada por hembras. Nosotros asumimos que esta exploración preferente refleja el carácter atractivo de las feromonas de macho. Otras posibilidades, como la exploración incrementada por la curiosidad que genera un estímulo novedoso o el un comportamiento de contramarcaje fueron exploradas en profundidad por Martínez-Ricós y colaboradores (2007), descartando estos efectos y concluyendo que realmente la investigación de las feromonas sexuales de macho se debe a sus propiedades atractivas. Además, el descubrimiento de que las feromonas de macho pueden utilizarse para condicionar una preferencia de lugar confirma que estos estímulos actúan como reforzantes naturales. Por lo tanto, según las teorías actuales acerca de la división del refuerzo en propiedades hedónicas del estímulo, motivación y aprendizaje (ver punto 4.1.4, Berridge y Robinson, 2003), durante la primera experiencia con las feromonas, el único componente que puede tener una influencia sobre el comportamiento es el primero. Como sugerimos previamente, la investigación intensa y persistente inducida por la presencia de feromonas de macho podría ser equivalente a la preferencia por una solución dulce frente a agua que muestran ratones que no han tenido

experiencia previa con este sabor (ver resultados del experimento de preferencia por una solución de sacarosa, en el punto 4.2.3), reflejando pues las propiedades placenteras del estímulo.

5.1.2 Efecto techo en el protocolo de preferencia por feromonas de macho

A lo largo de los experimentos explorando el papel de diversos neurotransmisores en la atracción innata que muestran las hembras de ratón por feromonas de macho hemos encontrado algunos fármacos que eliminaban su expresión comportamental y otras drogas que no la afectaban al compararla con los grupos de control tratados con salino, pero no hemos encontrado ninguna droga que aumentase significativamente la exploración preferente de las feromonas de macho.

Una explicación razonable de este hecho es que existe un efecto techo en nuestro test comportamental, es decir, durante los cinco minutos que dura la prueba, los animales utilizados como control están explorando el recipiente que contiene los estímulos de macho al máximo de sus posibilidades. Esta explicación es bastante plausible ya que las hembras tratadas con salino emplean alrededor de un 45% del tiempo del test (considerando las medidas tomadas con el sistema SMART) en explorar los alrededores del recipiente, en una zona que ocupa el 2% del área total de la caja. En este sentido, creemos que la propia biología del ratón, como animal presa, debe constreñir la exploración del estímulo apetitivo dentro de unos niveles de exploración de su entorno que le permitan comprobar la seguridad del mismo.

Por otro lado, comparando diversos métodos utilizados para evidenciar las preferencias olfativas en el hámster, Johnston (1981) demostró diferencias en las mismas según el sistema utilizado, aunque de acuerdo con su argumentación, el mejor protocolo fue uno parecido al empleado por nosotros. Por lo tanto, a pesar de la limitación que supone la existencia de este efecto techo, confiamos en que nuestro método, ya que protocolos similares han sido utilizados con éxito también en otros trabajos (Drickamer, 1989; Mossman y Drickamer, 1996).

Las posibilidades de eliminar un efecto techo pasan por disminuir la tasa de respuesta basal de los animales hacia el estímulo; por ejemplo disminuyendo la intensidad del mismo o incrementando la dificultad del animal por conseguirlo. La primera solución, por lo tanto, consistiría en utilizar orina de macho o viruta ensuciada por machos en distintas diluciones. La segunda, obligaría a variar el test de comportamiento utilizado, mediante el uso de obstáculos como las cajas empleadas en los tests de superación de aversiones, en las cuales el animal debe superar una rejilla electrificada que inflinge una suave descarga eléctrica o mediante el uso de protocolos operantes que exijan palanqueos crecientes. Sin embargo, estas soluciones implicarían un aprendizaje, y no nos permitirían estudiar la respuesta innata. De cualquier manera, en el futuro, estos paradigmas deberán ser adaptados utilizando feromonas como recompensa, cosa que además permitirá ampliar nuestros conocimientos acerca de la base neural del refuerzo inducido por estas señales químicas.

5.1.3 Interpretación de los resultados derivados de la administración sistémica de los fármacos

El principal problema que presenta la aproximación farmacológica aquí empleada, es decir, la administración intraperitoneal de las drogas, es la dificultad a la hora de interpretar el lugar de acción de los fármacos, responsable del efecto comportamental observado. De hecho, los efectos observados sobre la preferencia podrían ser secundarios a otros efectos provocados por los tratamientos, como una disminución inespecífica del comportamiento exploratorio debida a afectaciones motoras o sensoriales. Sin embargo, nuestro análisis nos permite descartar esta posibilidad.

En todos los experimentos hemos estudiado cuidadosamente los efectos de los fármacos sobre otros comportamientos efectuados por los sujetos experimentales y cuya afectación por parte del tratamiento podría repercutir sobre la capacidad de los animales de explorar activamente las feromonas de macho. Estos comportamientos han sido la locomoción, la investigación general de los recipientes, el comportamiento de escarbar y/o la función olfativa. En primer lugar, en la mayoría de los casos no hemos encontrado una relación directa entre un incremento o disminución de la actividad locomotora con la investigación preferencial de las feromonas de macho (como sucedió en el capítulo dedicado a las drogas dopaminérgicas, punto 4.1.3), aunque cuando los efectos de los fármacos han sido dramáticos sobre esta función siempre hemos indicado esta afectación como posible causa de una pérdida de preferencia (como con los fármacos serotoninérgicos, punto 4.3.3). Por

otro lado, nuestra medida de investigación general se ha mostrado bastante resistente a los tratamientos, viéndose afectada sólo en tres ocasiones (ver Tabla 20, página 209), sólo en dos de las cuales se asociaba a una variación de la preferencia. Hemos comprobado también que la pérdida de la preferencia no necesariamente se debía a una disminución de la motivación por explorar debido a la pérdida de las claves olfativas (Tabla 20). Por último, el significado funcional del comportamiento de escarbar se discutirá en el punto 5.2.

En segundo lugar, hemos tratado de utilizar tanto agonistas como antagonistas para poder comprobar que sus efectos eran opuestos, amén de emplear siempre un rango de dosis adecuado (ver punto 3.2.1) que nos permitiese comprobar los posibles efectos dependientes de dosis. Aunque, como hemos señalado, no conseguimos incrementar la preferencia de los animales en ningún caso, el hecho de que una droga afecte negativamente a un comportamiento y su antagonista no lo afecte, puede significar que existe un efecto techo para este comportamiento en este protocolo.

Una explicación alternativa sería que en condiciones fisiológicas normales el neurotransmisor estudiado se encuentre quiescente con respecto al comportamiento analizado, es decir, que no inhiba de forma tónica la actividad de las neuronas responsables de la expresión del mismo; lógicamente, los antagonistas no tendrían efecto sobre un comportamiento basado en un circuito con esta configuración. Por otro lado, la activación extrínseca de este sistema sí puede resultar en una alteración del comportamiento debido a la existencia de interneuronas inhibitorias que se activen únicamente bajo ciertas condiciones.

Sólo en una ocasión, cuando utilizamos las drogas serotoninérgicas, tanto el agonista como el antagonista ejercieron el mismo efecto negativo, aunque en el caso del antagonista acompañado de visibles efectos sedantes. Por un lado, estos resultados podrían deberse a la actuación de cada fármaco en un núcleo distinto, aunque no nos aventuramos a sacar conclusiones acerca del papel de este neurotransmisor.

En tercer lugar, nos hemos apoyado en los datos anatómicos y de expresión de receptores específicos de ratón, cuando éstos estaban disponibles, para poder afinar lo más posible el análisis sobre los sitios de actuación de las drogas.

Finalmente, somos bastante cautos en la interpretación de nuestros resultados, y tenemos muy claro que estos son los primeros experimentos que exploran la neuroquímica de los comportamientos inducidos específicamente por feromonas sexuales en las hembras de ratón, y que sus resultados servirán de base para futuras investigaciones que empleen la administración local de fármacos en los diversos núcleos propuestos para validar las hipótesis que han surgido a lo largo de este trabajo.

5.2 EL SIGNIFICADO FUNCIONAL DEL COMPORTAMIENTO DE ESCARBAR

Los roedores tienden a escarbar el sustrato como parte de su comportamiento natural, por ejemplo para construirse madrigueras o buscar alimento. Este comportamiento, en el ámbito del laboratorio, es el responsable de que los animales acaben enterrando objetos neutros que se introduzcan en sus cajas, como por ejemplo canicas en el llamado *marble burying test* (Gyertyán, 1991).

Así, en nuestros experimentos observamos la presencia de este comportamiento, así como que algunas drogas lo anulaban completamente (específicamente, los agonistas monoaminérgicos), mientras que otras lo incrementaron (el antagonista del receptor D2 de dopamina). La ignorancia acerca del significado funcional preciso de este comportamiento en el contexto de la detección de feromonas dificulta la interpretación de estos resultados. Algunos autores consideran este comportamiento como indicador de ansiedad, lo que les permite utilizarlo para comprobar los efectos ansiolíticos de las drogas (Broekkamp *et al.*, 1986; Li *et al.*, 2006). Otros interpretan la expresión de este comportamiento como modelo de desórdenes obsesivo-compulsivos (Gyertyan, 1991; Londei *et al.*, 1998), fundamentalmente en función de los efectos de fármacos estándar contra este síndrome sobre el escarbado y el comportamiento de enterrar canicas.

Estas hipótesis se basan en diversas evidencias. Primero, los roedores escarban tierra o arena en situaciones defensivas como al

enfrentarse a animales nocivos como escorpiones (Londei *et al.*, 1998) y también en el laboratorio para enterrar objetos amenazantes como rejillas de descarga eléctrica (Pinel y Treit, 1978). Así, podría interpretarse el comportamiento de enterrar canicas como una muestra de ansiedad, y, siendo que las canicas no son aversivas ni suponen amenaza alguna (Njungé y Handley, 1991a) como un comportamiento obsesivo. A esto habría que añadir que este comportamiento es disminuido por ansiolíticos clásicos como las benzodiazepinas (Broekkamp *et al.*, 1986) así como por drogas monoaminérgicas, utilizadas para tratar la depresión y los desórdenes obsesivo-compulsivos (Njungé y Handley, 1991a; 1991b).

Sin embargo, como hemos dicho las canicas no suponen un estímulo aversivo, y de hecho no son evitadas ni preferidas si se las presenta en una caja de dos compartimentos frente a uno vacío (Njungé y Handley, 1991a). Por ello, Deacon (2006), propone que los ratones no entierran las canicas deliberadamente sino que simplemente escarban como parte de su comportamiento natural.

Uno de nuestros resultados llamativos fue la comprobación de que los animales no tratados mostraban una marcada preferencia por escarbar la viruta que contenía las señales químicas de macho frente a la viruta de hembras. Esto no parece sorprendente, debido a que el tiempo escarbando forma parte del tiempo investigando, que es mayor sobre la viruta de macho; sin embargo, con estos datos no podemos comprobar si el comportamiento depende del estímulo, o simplemente está relacionado con los niveles de ansiedad del animal; por lo tanto

decidimos analizar un poco más a fondo los resultados de que disponíamos.

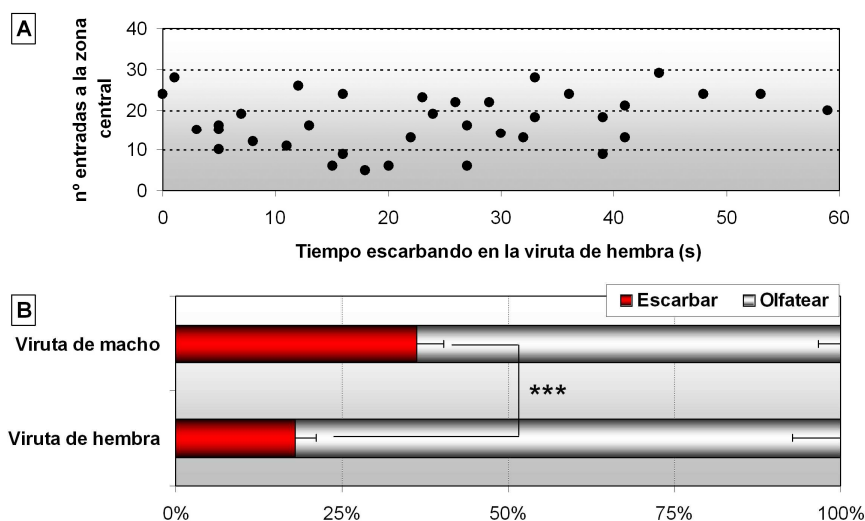


Figura 40. Comportamiento de escarbar en las hembras control tratadas con salino.

A. El número de entradas en la región central de la caja de test, que se asemeja mucho a la medida estándar de ansiedad en el test de campo abierto no muestra correlación con el comportamiento de escarbar. B. Las hembras emplean una proporción mayor del tiempo total de investigación escarbando en la viruta de macho que en la de hembra.

En primer lugar, agrupamos los datos procedentes de los grupos control de los experimentos 1.D.1, 1.D.2 y 3.A.2 (agonistas noradrenérgicos y agonista serotoninérgico, ver puntos correspondientes), en los que habíamos registrado tanto el tiempo escarbando como sus trayectorias mediante el sistema SMART, para intentar comprobar si existía alguna correlación entre el tiempo empleado escarbando en la viruta de hembra con una medida de ansiedad aceptada, como es el tiempo que los animales emplean en el centro de un campo abierto. Para ello, definimos una zona en el centro de la caja de 10 x 15 cm. (el 12% del área de la caja, de dimensiones 25 x 50 cm.), contamos el número de

entradas de los animales en la misma en el *control post-tratamiento*, tras la correspondiente inyección de Salino, y llevamos a cabo una correlación de Pearson con el tiempo total que emplearon los animales en escarbar la viruta de hembra en este test. Como puede verse en la Figura 40A, no encontramos correlación significativa entre ambas medidas (Correlación de Pearson=0.236), lo cual sugiere que los animales más ansiosos, que evitan el centro de la caja, no muestran un comportamiento de escarbar incrementado respecto a los menos ansiosos.

Por otro lado, para comprobar si el comportamiento de escarbar podía ser efectivamente afectado por el tipo de estímulo que contenía la viruta, utilizamos las hembras de los grupos controles del experimento 1A, de las cuales poseíamos los datos exactos de investigación (ver Material y Métodos, punto 3.4) y calculamos qué porcentaje de este tiempo pertenecía a la actividad escarbar y cual a olfatear. Se aprecia claramente en la Figura 40B cómo el porcentaje escarbando fue significativamente mayor sobre la viruta de macho que sobre la de hembra (t de Student para medidas relacionadas, $t_{32}=-4.476$, $p<0.001$). El resultado es el mismo si tenemos en cuenta las hembras de los grupos controles de los experimentos 1.D.1, 1.D.2 y 3.D.2, es decir, analizando el porcentaje de tiempo escarbando en relación al tiempo pasado en cada zona (viruta de hembra, $11\% \pm 2$, $p=0.007$ *vs.* viruta de macho, $19\% \pm 2$).

Estos datos sugieren un papel del comportamiento de escarbar en la investigación de señales químicas. Por ejemplo, la actividad de escarbar podría facilitar la búsqueda y detección de las feromonas, específicamente cuando estas son atractivas como es el caso de las feromonas sexuales. De hecho, la detección de estímulos vomeronasales

requiere especializaciones tanto fisiológicas como comportamentales, como el mecanismo de movimientos de la lengua (*tongue-flick*) en serpientes (Kubie y Halpern, 1975; Martínez-Marcos *et al.*, 2001), del hocico (*muszling*) en la zarigüeya (Poran *et al.*, 1993) o en los ungulados (*flehmen*) (Ladewig *et al.*, 1980), pero estos elementos no han sido descritos en ratón. Sin embargo, las evidencias en otras especies sugieren un mecanismo de bombeo descrito originariamente en el hámster (Meredith y O'Connell, 1979), común al resto de mamíferos (Halpern y Martínez-Marcos, 2003). Dado que el contacto más próximo con la viruta, y por tanto con las feromonas que contiene, se produce cuando las hembras introducen el morro en ella mientras la escarban, podríamos pensar que el bombeo vomeronasal pueda tener lugar en este momento.

Sin embargo, hemos visto cómo los animales tratados con algunas drogas no escarban preferencialmente o tienen reducido este comportamiento, pero muestran el mismo patrón de preferencia que los animales tratados con salino (como en el caso del tratamiento con el quinpirol, la yohimbina y ciertas dosis del DOI, ver Tabla 20). Por lo tanto, aunque mientras los animales escarban tenga lugar la detección de las feromonas, no debe tratarse de un comportamiento imprescindible para la misma. Por lo demás, el tiempo escarbando parece más sensible que la investigación *in toto* a la manipulación farmacológica. En este sentido, las drogas variaron las proporciones que hemos visto que se expresan en los animales sin tratamiento. Así, aunque con el sulpiride las hembras escarbaban mucho más la viruta de macho que la de hembra (ver Figura 14, página 84), el incremento de este comportamiento sobre la viruta de hembra dio lugar a que se eliminaran las diferencias en las

proporciones de escarbado en ambos tipos de viruta (viruta de hembra, $37\% \pm 11$ vs. viruta de macho, $49\% \pm 4$, $p=0.316$). Por su parte, los animales tratados con el quinpirol y el DOI, pese a mostrar preferencia por investigar la viruta de macho, no presentaron un escarbado preferente sobre ésta (Figura 16, página 91, Figura 31, página 148).

A nuestro modo de ver, en nuestro modelo, los animales escarban la viruta no compulsivamente, sino como parte de su comportamiento normal de exploración, como sugiere el hecho de que lo hagan en una proporción mayor cuando este sustrato contiene señales atractivas. En este contexto, el tratamiento con las diversas drogas puede variar la capacidad de selección de la respuesta adecuada por parte del animal, ocasionando en primer lugar que se inhiba el comportamiento de escarbar y finalmente la exploración preferente, como ilustra perfectamente el caso del DOI (Figura 31, página 148). Finalmente, la actividad de escarbar es fundamentalmente motora y quizá por este motivo sea más sensible a determinados fármacos que afectan al sistema locomotor, como en el caso de los dopaminérgicos.

5.3 SOBRE LA POSIBLE NATURALEZA DE LAS FEROMONAS INNATAMENTE ATRACTIVAS

Una de las críticas que nos hemos encontrado habitualmente a lo largo del desarrollo de nuestros trabajos es la de no poseer la caracterización bioquímica de la o las feromonas que producen el comportamiento de intensa investigación preferente, utilizando en su lugar viruta ensuciada por machos, que contiene todo tipo de señales químicas secretadas y excretadas por éstos. Sin embargo, experimentos comportamentales llevados a cabo en nuestro laboratorio nos han proporcionado algunas pistas acerca de su naturaleza.

Resultados previos mostraban que las feromonas innatamente atractivas para las hembras son sustancias de baja volatilidad (Moncho-Bogani *et al.*, 2002; 2005; Martínez-Ricós *et al.*, 2007). La reciente demostración de que la atracción innata de las hembras por feromonas sexuales de macho depende de la integridad del bulbo olfativo accesorio (Martínez-Ricós *et al.*, *in press*), y por lo tanto del sistema vomeronasal, confirma que, al menos estas feromonas, deben ser sustancias no volátiles. Además, la producción de la o las feromonas atractivas es dependiente de testosterona, dado que como ya sabemos, la viruta de macho castrado no resulta atractiva ni es capaz de inducir preferencia de lugar (Martínez-Ricós *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta todos estos datos en el contexto de los descubrimientos sobre la naturaleza química de las

sustancias que se han caracterizado como posibles feromonas, estamos en disposición de proponer diversas moléculas como candidatas.

Por un lado, se ha descrito que los péptidos asociados al MHC, que cumplen con la condición de baja volatilidad, pueden participar tanto en los efectos endocrinos tales como la interrupción del embarazo cuando las hembras preñadas son expuestas a orina de un macho extraño (efecto Bruce, Bruce, 1959; Leinders-Zufall *et al.*, 2004), como en la prevención de la endogamia, dado que los ratones son capaces de elegir como parejas a aquellos congéneres con un MHC diferente al suyo (Yamazaki *et al.*, 1976; Eklund, 1998). Sin embargo, la producción de estos péptidos no es dependiente de testosterona, lo que los descarta como responsables de la respuesta de atracción.

Por el contrario, la síntesis en masa de las llamadas *proteínas urinarias principales* (*Major Urinary Proteins*, MUPs), que tiene lugar en el hígado, sí es dependiente de testosterona (Cavaggioni y Mucignat-Caretta, 2000; Hurst *et al.*, 2001), aunque las hembras también producen pequeñas cantidades. Estas proteínas, debido a su alto peso molecular (alrededor de 20 kDa), no son volátiles, y entre otras funciones, parecen imprescindibles para el marcaje territorial competitivo que llevan a cabo los machos (Hurst y Beynon, 2004). Además, unen pequeñas moléculas volátiles como (R,R)-3,4-dehydro-exobrevicomina y (DB),(S)-2-sec-butyl-4,5-dihydrothiazol (Sharrow *et al.*, 2002). Se ha demostrado, usando en ocasiones sus análogos sintéticos, que ambas sustancias atraen a las hembras y repelen a los machos (Mucignat-Caretta *et al.*, 1998), y que actúan sinérgicamente provocando en las primeras el efecto Whitten (ver página 34) (Jemiolo *et al.*, 1986) y en los segundos comportamiento

agresivo (Novotny *et al.*, 1985). Señalamos que, aunque estos trabajos sugerían que eran estas moléculas volátiles, y no las MUPs, las responsables de algunos de los efectos endocrinos y comportamentales, es más probable que sea necesaria la acción conjunta de ambas moléculas. En primer lugar, para que estas pequeñas moléculas fuesen activas, era necesario añadirlas a orina de macho castrado, lo cual aporta una pequeña cantidad de MUPs. Por otro lado, mientras las MUPs son específicas de cepa, las sustancias volátiles que unen no sólo son comunes a toda la especie, sino que se encuentran en una variedad extraordinaria de otros mamíferos, insectos e incluso plantas (revisado en Dulac y Torello, 2003). Por lo tanto, debe existir un mecanismo de reconocimiento de especie, proporcionado por las MUPs, y los péptidos MHC, para impedir situaciones ridículas, como la de hembras de ratón sintiéndose atraídas por escarabajos, o escarabajos por elefantas (Goodwin *et al.*, 2006). Es más, la detección de sustancias volátiles por parte de las neuronas del epitelio vomeronasal, hasta la fecha, se ha demostrado *in vitro* (Boschat *et al.*, 2002; Zufall *et al.*, 2002), existiendo una única evidencia *in vivo* (Trinh y Storm, 2003), por lo que es probable que las sustancias volátiles necesiten a las MUPs como transportadores para poder introducirse en el órgano vomeronasal o bien que ambas moléculas ejerzan una acción cooperativa, de manera que sean necesarias ambas (MUPs y volátiles asociados) para que el estímulo sea efectivo. En este sentido, se ha sugerido que la porción anterior del bulbo olfativo accesorio responde a los componentes volátiles, mientras que la parte posterior parece especializada en la detección de compuestos no volátiles (Sugai *et al.*, 2006). Por una parte, los receptores de tipo V1R (Dulac y

Axel, 1995) se expresan en la porción apical del epitelio vomeronasal que proyecta a la porción anterior del bulbo olfativo accesorio, presentan características similares a los receptores olfativos; por el contrario, la estructura de los V2R (Herrada y Dulac, 1997; Matsunami y Buck, 1997; Ryba y Tirindelli, 1997), expresados por las neuronas sensoriales basales del epitelio vomeronasal, que inervan la porción posterior del bulbo, muestran una estructura muy diferente, con un extremo N-terminal muy largo por el cual interaccionarían con sus ligandos. De hecho, algunas de las neuronas que expresan V2R responden específicamente a las MUPs (Chamero *et al.*, 2007) y a los péptidos MHC (Leinders-Zufall *et al.*, 2004). Así, las MUPs no sólo actuarían como transportadores de la molécula volátil hacia el interior del órgano vomeronasal, sino que se daría el procesado coordinado de ambas moléculas, cada una en una porción del bulbo.

Adicionalmente, sabemos que las porciones anterior y posterior del bulbo olfativo accesorio se activan preferentemente, según la detección de c-fos, frente a estímulos diferentes. Así, la porción anterior del bulbo olfativo accesorio lo hace en respuesta a viruta ensuciada por congéneres del sexo opuesto (Moncho-Bogani *et al.*, 2002; Dudley y Moss, 1999), mientras que la porción caudal se activa predominantemente en machos frente a la detección de feromonas de otros machos de una cepa distinta (Kumar *et al.*, 1999). Experimentos comportamentales nos proporcionan otras evidencias sobre el papel de cada porción del bulbo. Por ejemplo, la delección de un grupo de receptores V1R da lugar a un comportamiento sexual anómalo en los machos, que no presentan un incremento del número de montas con la

experiencia (Del Punta *et al.*, 2002); asimismo, la agresividad maternal se encuentra reducida en estos animales, pero no el comportamiento agresivo en machos (Del Punta *et al.*, 2002) (recordemos que la agresión maternal y la masculina parecen depender de vías distintas, ver punto 4.3.4). Por otro lado, la detección de MUPs, sin sus ligandos volátiles, es suficiente para inducir la agresión en machos (Chamero *et al.*, 2007). Además, las diversas porciones del bulbo olfativo accesorio proyectan a zonas específicas de la amígdala de la zarigüeya (Martínez-Marcos y Halpern, 1999) y en la rata (Mohedano-Moriano *et al.*, 2007), aunque este punto no está demostrado en el ratón (von Campenhausen y Mori, 2000). Así, la coordinación de la activación de cada porción en respuesta a las señales complejas de la orina, junto con los patrones tanto divergentes como convergentes de la inervación amigdalina por parte de estas porciones proporcionan un mecanismo mediante el cual se deben controlar los diversos comportamientos y reacciones endocrinas derivados de la exposición a feromonas en los distintos sexos.

La importancia relativa del sistema olfativo y del sistema vomeronasal en la comunicación intraespecífica constituye un punto de interés adicional, aunque los trabajos expuestos en la presente tesis doctoral no arrojan luz sobre este particular. Las investigaciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio muestran la importancia de la experiencia con las feromonas no volátiles para la adquisición de preferencia por volátiles de macho. Estos resultados apoyan la hipótesis sugerida por Meredith (1986) según la cual las sustancias químicas de alto peso molecular detectadas por el órgano vomeronasal provocan

comportamientos innatos -la cópula en el hámster macho (Meredith, 1986); la huida de un predador, el gato, en ratas (Dielenberg y McGregor, 1999) o la búsqueda activa de las feromonas de un posible compañero sexual por parte del ratón hembra (nuestros resultados)-, mientras que las señales olfativas pueden actuar como estímulo condicionado, asociándose con estas feromonas, para dar lugar a su vez a los citados comportamientos. Muy probablemente, esta asociación debe producirse donde ambos sistemas convergen, es decir, en la amígdala (Scalia y Winans, 1975; Martínez-García *et al.*, 1991; Lanuza y Halpern, 1997). Para profundizar sobre este tema, sugerimos al lector interesado consultar alguna de las múltiples revisiones existentes (Restrepo *et al.*, 2004; Baxi *et al.*, 2006).

5.4 LA NEUROQUÍMICA DEL REFUERZO INDUCIDO POR FEROMONAS

La integración de nuestros resultados derivados de los experimentos farmacológicos (un resumen de los cuales se muestra en la Tabla 20) y de lesiones, con los datos anatómicos de que disponemos (Novejarque, 2007) trazan con bastante fiabilidad la vía mediante la cual las feromonas de macho resultan innatamente atractivas para las hembras de ratón (Figura 41).

Así, el comportamiento innato de preferencia por las feromonas de macho sobre las feromonas de hembra (resultados de esta tesis) o de macho castrado (Martínez-Ricós *et al.*, 2007) debe estar controlado por la vía de conexiones glutamatérgicas que parte del bulbo olfativo accesorio y llega al estriado ventral, específicamente a la zona de los islotes de Calleja mediales, pasando por la amígdala posteromedial cortical. La actividad de las neuronas glutamatérgicas de esta vía se encuentra regulada negativamente por la dopamina y los opiáceos, y positivamente por el NO (Figura 41).

Ya a nivel del bulbo olfativo accesorio, la gran reactividad de la detección histoquímica de la actividad NADPH diaforasa, específica, en la capa glomerular, de la porción anterior -la que se activa frente a feromonas de congéneres del sexo opuesto (Moncho-Bogani *et al.*, 2005; Dudley y Moss, 1999)- nos hizo pensar que el NO podría ser fundamental para el correcto procesado de las feromonas a ese nivel, idea consistente con la eliminación de la preferencia por la dosis alta del

antagonista del NO. Sin embargo, el hecho de que los animales tratados con esta dosis del fármaco detectasen la orina de macho en un test de discriminación olfativa demuestra que el tratamiento no provocaba una anosmia dramática. Si bien estos resultados son compatibles con una anosmia vomeronasal inducida por el fármaco, es más probable un efecto motivacional, apuntado también por otros (Trainor *et al.*, 2007).

Los bulbos olfativos accesorios envían sus proyecciones a la amígdala posteromedial cortical, cuyas neuronas expresan una cantidad ingente de receptores μ -opiáceos. Este hecho, junto a otras evidencias comportamentales utilizando agonistas opioidérgicos (como los trabajos de McGregor y Herbert, 1992), y sobre la inhibición de las neuronas glutamatérgicas de estructuras corticales por parte de las interneuronas opioidérgicas (Giacchino *et al.*, 1998) nos permite sugerir que el agonista específico de los receptores μ (fentanilo) podría actuar a este nivel, impidiendo la activación de la vía amígdalo-estriatal por los estímulos vomeronasales. Ya en el estriado ventral, se ha demostrado que la dopamina, actuando a través de los receptores D1, inhibe los potenciales post-sinápticos excitatorios provocados por la estimulación de la amígdala en las neuronas espinosas estriatales (Charara y Grace, 2003). Este hallazgo nos llevó a proponer que tanto el agonista específico de D1 (SKF 38393) como la anfetamina podían estar interfiriendo con la llegada de la señal vomeronasal desde amígdala al estriado ventral. También el efecto del agonista de serotonina (DOI) podría deberse a esta acción, visto que esta droga incrementa los niveles de dopamina en el estriado (Lucas y Spampinato, 2000).

Fármaco	Dosis (mg/kg)	Locomoción	Investigación general	Preferencia por feromonas de macho	Escabar	Escarbado preferente	Discriminación olfativa	Adquisición de PCL por feromonas de macho	Preferencia por una solución de sacarosa
SCH 23390 Antagonista D1	0.02	=	=	=	=	=		=	
	0.05	↓↓	=	=	=	=		=	
Supiride Antagonista D2	20	=	=	=	↑	↑		=	
Anfetamina Agonista dopamina	0.5	=	=	0	↓	↓	↑		
SKF 38393 Agonista D1	2	↑	=	0	0	0	↓		
	10	↓↓↓	↓↓↓	0	0	0			
Quinpirol Agonista D2	20	↓↓↓	↓↓↓	0	0	0			
	0.2	↓↓↓	=	=	↓↓	↓↓			
Desipramina Agonista noradrenalina	1	↓↓↓	↓↓↓	0	↓↓	↓↓			
	10	↓↓↓	=	=	=	=			
Yohimbina Antagonista α2	20	↓↓↓	=	=	=	=			
	1	=	↓	=	↓	=			
Naloxona Antagonista opiáceo	1	=	=	=				=	0
	10	=	=	=				=	0
Fentamilo Agonista μ-opiáceo	0.5	=	=	0					=
	1	=	=	0					0
Ketanserín Antagonista 5-HT2A	0.5	=	=	=					
	1	↓	=	0					
DOI Agonista 5HT-2A	2	↓	=	0					
	0.5	=	=	=	=	↓			
L-NAME Antagonista NO	1	=	=	=	↓	↓			
	2	=	=	0	↓	↓			
	50	=	=	=					
	100	=	=	0			=		

Tabla 20. Resumen de los efectos comportamentales medidos para cada fármaco y dosis en el total de los experimentos farmacológicos.

Clave (0)=comportamiento no expresado; (=)=no hay diferencias; (↓)=disminución; (↑)=incremento. Los símbolos expresan las diferencias respecto al salino.

Por último, la demostración de que la integridad de los islotes de Calleja localizados medialmente es necesaria para la expresión de la atracción innata (mediante las lesiones electrolíticas que comprendían la mayor parte del islote de Calleja magno) nos permite integrar los resultados de los tratamientos dopaminérgicos con los del antagonista del NO en estas estructuras. Fijémonos en primer lugar en la inervación procedente del área ventral tegmental, que acaba en la zona periférica a las interneuronas granulares de los islotes (Fallon *et al.*, 1983; Martínez-Hernandez, *et al.*, observaciones no publicadas). Todas estas neuronas expresan el RNA mensajero del receptor D3 (Díaz *et al.*, 1995), y en la mayoría de los casos este receptor coexiste con el D1 (Ridrey *et al.*, 1998). Curiosamente, y al contrario de lo que sucede en la porción adyacente del núcleo accumbens, ambos receptores ejercen efectos opuestos, como puede observarse en el caso de la producción de la proteína de activación celular c-fos, incrementada por la activación de D1 y disminuida por D3 (Ridrey *et al.*, 1998). Así, el incremento de la actividad de las interneuronas granulares, GABAérgicas, tras el tratamiento con un agonista de los receptores D1 podría dar lugar a una inhibición de las neuronas eferentes.

Por otro lado, las interneuronas granulares pueden comunicarse mediante acoplamiento efáptico gracias a las conexiones de tipo *gap* que presentan (Ribak y Fallon, 1982), y se ha observado que el tratamiento con agonistas del receptor D3 *in vitro* promueve la sincronización de la actividad eléctrica de estas neuronas (Halliwell y Horne, 1998). Por el contrario, la activación de los receptores D1 podría ser disruptiva para esta sincronización, como evidencia el desacoplamiento de las neuronas

en la retina, el hipocampo y el propio estriado provocado por agonistas de D1 (Lasater, 1987; O'Donnell y Grace, 1993; Velazquez *et al.*, 1997). Estas evidencias nos llevan a hipotetizar que esta sincronización pudiera ser necesaria para el correcto funcionamiento de los islotes de Calleja, cosa que sería consistente con nuestros resultados opuestos sobre el comportamiento de los animales tratados con el agonista D1 y con el agonista D2/D3, de pérdida y conservación de la preferencia por feromonas respectivamente. Apoyando esta hipótesis, se ha observado que el NO promueve la sincronización de las neuronas estriatales en respuesta a la actividad de sus aferencias desde la corteza, como muestra la virtual eliminación de acoplamiento, medido mediante un colorante fluorescente *in vitro*, tras un tratamiento con L-NAME (O'Donnell y Grace, 1997). De esta manera, la sincronización de las neuronas granulares de los islotes de Calleja, promovida por el NO y la acción de la dopamina a través de los receptores D3 podría ser importante para la sintonización de la transmisión de estos núcleos, explicando que su probable desacoplamiento en los animales tratados con el agonista de D1 y el antagonista de NO tenga como resultado la eliminación del comportamiento de exploración preferente de las feromonas de macho. Esta hipótesis predice que los agonistas específicos de D3, al favorecer el acoplamiento de las células granulares, tenderían a aumentar la preferencia por feromonas masculinas. Por otro lado, los antagonistas D3 deberían presentar el efecto contrario, tanto a nivel celular como comportamental. Sin embargo, el quinpirol, que presenta una afinidad significativa sobre los receptores D3, no fue capaz de incrementar la preferencia, mientras que el sulpiride, de que se sabe que posee cierta

actividad antagonista sobre estos receptores (Vallone *et al.*, 2000), no suprimió la preferencia, sino que provocó una tendencia al alza de la misma debida al incremento en la actividad de escarbar (ver Figura 14C, página 84).

De todas formas, la acción dopaminérgica no es imprescindible para la expresión de la atracción por feromonas de macho, puesto que las lesiones del área ventral tegmental no la alteran (Martínez-Hernández *et al.*, 2006). No obstante, esta proyección puede estar implicada en el aprendizaje de estímulos asociados a las feromonas, como sugiere el hecho de que la expresión de c-fos en el área ventral tegmental no se vea afectada cuando los animales exploran por primera vez la viruta ensuciada por machos pero se incrementa ante la detección de los olores volátiles tras su asociación con el componente no volátil (Moncho-Bogani *et al.*, 2005).

En segundo lugar, la ingente cantidad de actividad NADPH diaforasa en los islotes de Calleja apunta a una gran importancia de la señalización por NO en ellos, que podría afectar a este nivel de dos maneras. Primero, las preparaciones de NADPH diaforasa de la colección de nuestro laboratorio y otras evidencias (de Vente *et al.*, 1998) revelan que esta actividad se concentra en fibras que rodean tanto a las neuronas granulares como al neuropilo, afectando por lo tanto a las neuronas medianas y grandes, colinérgicas, que dan lugar a la mayoría de las eferencias de los islotes. A este respecto, se ha visto que el NO promueve la actividad de las neuronas colinérgicas en el estriado, incluso en presencia de antagonistas de glutamato (Centonze *et al.*, 2001). Por tanto, la actividad nitrérgica puede ser crucial para la transmisión de la

señal vomeronasal procedente de la amígdala hacia las neuronas de proyección de los islotes de Calleja, explicando que el tratamiento con un antagonista de la síntesis de NO elimine el comportamiento de preferencia por las feromonas de macho. Por otro lado, el NO podría actuar retroalimentando la señal procedente de las aferencias glutamatérgicas, y por tanto amplificando la señal vomeronasal, dado que se ha visto que este neurotransmisor gaseoso incrementa los niveles de glutamato en el estriado (Guevara-Guzman *et al.*, 1994; Trabace y Kendrick, 2000).

Todos estos razonamientos necesitarán ser comprobados en futuros experimentos, mediante la inyección focal de fármacos antagonistas específicos de los marcadores presentes en los islotes de Calleja, incluyendo la reinvestigación del papel de la dopamina mediante fármacos específicos de los receptores D3, así como de los receptores 2-HT2A de serotonina, ionotrópicos de glutamato y las diversas isoformas de la NOS.

Por último, antes de pasar a discutir la neuroquímica de los procesos de aprendizaje asociados a las feromonas, queremos exponer que quedan otros neurotransmisores y neuropéptidos no estudiados aquí que podrían estar implicados en la expresión de la atracción innata por feromonas de macho. Por ejemplo, sería interesante comprobar el efecto de antagonistas colinérgicos para demostrar la implicación de las eferencias de las neuronas colinérgicas de los islotes de Calleja. La administración de NPY en esta zona nos ayudaría a comprobar si este péptido, además de inhibir la reproducción a nivel hipotalámico, pudiera

estar implicado en los comportamientos apetitivos asociados, como es la atracción por feromonas.

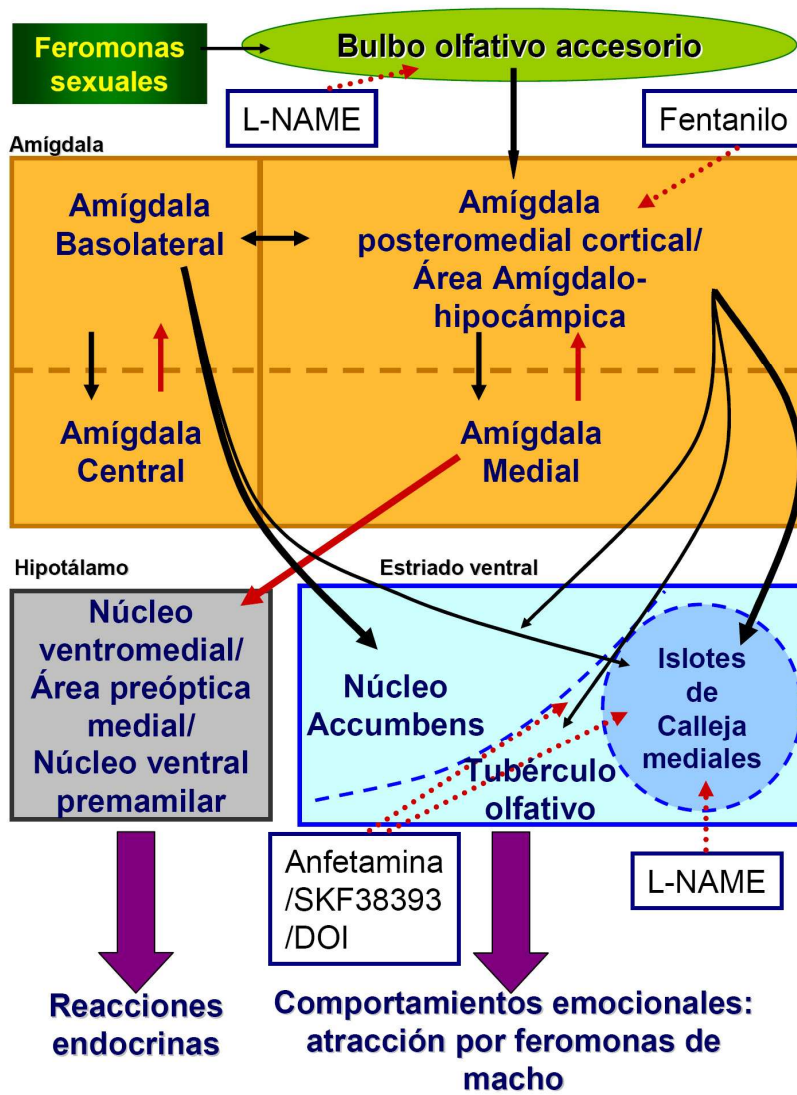


Figura 41. Esquema del circuito más probable de control de los comportamientos y reacciones endocrinas mediadas por feromonas sexuales, y los sitios de acción más probables de las drogas utilizadas.

Las proyecciones glutamatérgicas se simbolizan como flechas negras, mientras que las GABAérgicas lo hacen por flechas rojas. Ver texto para explicación.

Otro de los objetivos de esta tesis era estudiar la neuroquímica de los procesos de aprendizaje inducidos por las feromonas, y elegimos para ello el condicionamiento de preferencia de lugar. Sin embargo, ni los antagonistas dopaminérgicos ni los opioidérgicos se mostraron eficaces para impedir este aprendizaje. Estos resultados indican que ni el sistema dopaminérgico ni el opioidérgico participan en la adquisición de la preferencia condicionada, aunque no poseemos datos acerca de su implicación en la consolidación de la memoria o en la expresión del condicionamiento.

Quizá una buena estrategia en este caso sería investigar en primer lugar el núcleo cerebral donde tiene lugar la asociación entre las feromonas y su localización. Esto podría realizarse mediante experimentos de lesión como los expuestos aquí, o bien mediante la infusión de, si asumimos un proceso dependiente de potenciación sináptica, antagonistas glutamatérgicos en diversos núcleos.

Una posibilidad es que, como hemos venido apuntando, la asociación de las feromonas con otros estímulos tenga lugar en la amígdala basolateral, y que la interacción con el estriado ventral sea clave para la expresión del condicionamiento, como se demostró para el caso de otro reforzante natural, la sacarosa (Everitt *et al.*, 1991). Existen otras pruebas anatómicas y electrofisiológicas que apoyan esta visión. Así, se ha demostrado que la inervación proveniente del hipocampo y de la amígdala basolateral convergen en neuronas individuales del núcleo accumbens (French y Totterdell, 2003) y además la activación de las aferencias amigdalinas incrementa la respuesta de las neuronas a la activación concurrente desde el hipocampo, mientras que la activación

hipocámpica inhibe la respuesta a la estimulación amigdalina (Mulder *et al.*, 1998). Vemos enseguida que este circuito permite el establecimiento de relaciones contexto(hipocampo)-recompensa(amígdala) a nivel del núcleo accumbens.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que no todos los aprendizajes que parecen implicar una componente espacial la poseen realmente. A este respecto, existe una gran influencia de las claves de que disponga el sujeto y el tipo de protocolo utilizado sobre la estrategia de navegación elegida por el mismo (McDonald y White, 1995). Así, la teoría de los múltiples sistemas de memoria paralelos (White y McDonald, 2002) propone que existen tres circuitos que controlan diversos modos de aprendizaje, a saber, el hipocampo, el estriado dorsal y la amígdala, que se ocuparían de las asociaciones entre estímulos que definen una localización, las asociaciones estímulo-respuesta y las asociaciones estímulo-recompensa, respectivamente. Estos tres sistemas, funcionando en paralelo, son competitivos (McDonald y White, 1994; Ito *et al.*, 2006). Recientemente se ha demostrado, utilizando un paradigma que usa un laberinto en Y junto con la presencia de claves visuales como predictores, que la influencia de la amígdala basolateral en el establecimiento de preferencia de lugar condicionada por diversas drogas se debe precisamente a que los animales, bajo ciertas condiciones experimentales, no utilizan una estrategia espacial en su reacción de aproximación a la recompensa, sino que su respuesta está guiada por otras claves presentes en el ambiente (Ito *et al.*, 2006). En este contexto, nuestro protocolo de condicionamiento de preferencia de lugar es distinto a los que se usan habitualmente no sólo en el hecho de que los

sujetos experimentales tienen libre acceso a la exploración activa de la caja durante las sesiones de condicionamiento, y por lo tanto experimentan a la vez tanto la recompensa como la no-recompensa, sino también porque las claves visuales presentes se limitan, al tratarse de una caja opaca en una habitación blanca, con la posición de la cámara y del aparato de aire acondicionado sobre la caja como únicas pistas para la orientación. En estas condiciones, no podemos descartar que los animales se orienten en base a claves idiotéticas, basadas en el movimiento animal hacia la derecha o hacia la izquierda desde una posición de salida siempre constante. Según la argumentación de McDonald y White, este tipo de aprendizaje podría depender del estriado dorsal, dado que la recompensa actúa como un reforzante de la respuesta de orientación del animal hacia la zona que la contiene. Así pues, si el aprendizaje dependiese bien del estriado dorsal, bien de la interacción entre la amígdala y el accumbens, es sorprendente la falta de efecto de los antagonistas de la dopamina en la adquisición de preferencia de lugar condicionada por feromonas de macho, y nos llevaría a una reinvestigación necesaria del tema.

Otra opción interesante sería estudiar la posibilidad de que sea la propia amígdala cortical, y no la basolateral, la que se encargara de los procesos asociativos. Así, la amígdala posteromedial cortical recibe proyecciones masivas desde la división basolateral, mientras que la innervación recíproca es escasa (Kemppainen *et al.*, 2002; Pitkänen, 2000). Esta proyección permitiría la integración de la información de otras modalidades sensoriales, procedentes del núcleo lateral, con la información feromonal a nivel del núcleo posteromedial cortical. Por

otro lado, la amígdala vomeronasal proyecta moderadamente y con una topografía clara sobre la formación hipocámpica (Kemppainen *et al.*, 2002), recibiendo proyecciones ligeras de vuelta (Pitkänen, 2000). Estos patrones de inervación proporcionan una ruta a través de la cual la información feromonal puede influir sobre el establecimiento de memorias dependientes de hipocampo.

En resumen, las propiedades innatamente atractivas de las feromonas sexuales de macho para las hembras de ratón no dependen de la señalización dopaminérgica ni opioidérgica. Por el contrario, los tratamientos farmacológicos que incrementan la transmisión opioidérgica o la dopaminérgica son capaces de afectar negativamente a la expresión de este comportamiento. Basándonos en nuestros resultados y en los datos neuroanatómicos presentes en la literatura, sugerimos como hipótesis más probable que la expresión comportamental de la atracción por feromonas dependa de la transmisión glutamatérgica que porta la información vomeronasal al estriado ventral, acompañada de la liberación de NO en ciertos núcleos. Por otro lado, la neuroquímica de los procesos de aprendizaje asociados necesita todavía una investigación exhaustiva, que aclare en primer lugar cuales son los núcleos cerebrales implicados. Obviamente, estos núcleos dependerán en gran medida de la tarea de aprendizaje que se emplee.

5.5 ¿EXISTE UN “CENTRO DEL PLACER” EN LA CIRCUITERÍA NEURAL DEL REFUERZO?

El aporte fundamental de las últimas teorías sobre el papel de la dopamina en los procesos del refuerzo (Salamone y Correa, 2002; Berridge y Robinson, 2003), a nuestro modo de ver, estriba en el empeño por establecer claramente niveles de análisis distintos en los que se investiguen por separado los núcleos que codifican las propiedades *hedónicas* de las recompensas por un lado y los estados motivacionales que generan la intensidad con que un animal trabajará para conseguir la recompensa por otro, así como aquellas estructuras implicadas en el aprendizaje emocional. Ya comprobamos en la sección dedicada a la dopamina que la falta de tal precaución contribuyó durante mucho tiempo a la creencia errónea de que este neurotransmisor era clave para la sensación placentera provocada por las recompensas, cuando las nuevas hipótesis sugieren más bien a una implicación en el aprendizaje o la motivación.

Pese a que, desde un punto de vista antropocéntrico, argumentar que una recompensa dada posea un valor placentero para un roedor parezca una falacia, algunas respuestas innatas de los animales, tal vez muy simples, hacia ciertos estímulos apetitivos nos pueden ayudar a investigar de manera directa, y sin necesidad de que medie una respuesta comportamental aprendida, el o los supuestos *centros del placer*. De hecho, podemos argumentar que la sencillez de estas respuestas facilita la comprensión de los mecanismos neurales subyacentes a las mismas.

Una de las preguntas que surge de manera inmediata cuando observamos que la actuación de algunas drogas, como las opioidérgicas, es opuesta sobre los comportamientos consumatorios hacia recompensas de tipo sexual, como las feromonas, y hacia recompensas de tipo ingestivo, como las soluciones azucaradas, es la de si existe un único núcleo cerebral cuya activación tras la detección de una recompensa cualquiera da lugar a un estado afectivo placentero o si por el contrario, existe un centro del placer para cada tipo de recompensa natural.

Sin duda, la aproximación que se ha utilizado con mayor éxito en este sentido ha sido la del estudio de las reacciones faciales afectivas provocadas por la ingesta de soluciones dulces. Así, se ha comprobado que estas expresiones, que implican un patrón específico de protrusiones de la lengua fácilmente reconocibles, se encuentran conservadas en neonatos humanos, primates y ratas (Berridge, 2000). Esta reacción innata se ha interpretado como un reflejo del valor hedónico de este estímulo para los animales; la otra cara de la moneda se encuentra en el patrón de gestos y movimientos linguales frente al sabor amargo. Recordemos que Pecina y Berridge, (2005) demostraron recientemente la existencia de ciertos *puntos calientes* en el *shell* del núcleo accumbens en los cuales la microinyección de agonistas opioidérgicos desencadenan las citadas reacciones faciales afectivas, sugiriendo que son esas microestructuras las que codifican el valor afectivo positivo de los alimentos dulces.

Nuestros resultados nos permiten sugerir que el comportamiento de investigación preferente de las feromonas de macho por parte de las hembras es consecuencia del impacto hedónico de este estímulo (ver

punto 4.1.4 y 5.1.1), de la misma manera que las expresiones faciales de lo son de la sensación placentera provocada por el sabor dulce. Esta interpretación viene refrendada por el hecho de que la preferencia se mantenga a lo largo de tests sucesivos (Martínez-Ricós *et al.*, 2007) y de que sea independiente del estado hormonal de las hembras (Moncho-Bogani *et al.*, 2004), lo que indica que no es una atracción secundaria a la receptividad sexual.

El descubrimiento de que la lesión de la parte específica del estriado ventral centrada en el islote de Calleja magno elimina la investigación preferente de feromonas de macho, abre la sugerente posibilidad de que existan *puntos calientes* para las feromonas sexuales, análogos a los descubiertos por Peciña y Berridge para el sabor dulce. Estos puntos calientes podrían encontrarse en los mismos islotes de Calleja, y por lo tanto futuros experimentos que manipulen de manera más fina estas estructuras nos darían la clave del problema planteado.

Así, pese a que los distintos estímulos reforzantes son detectados por diversos sistemas sensoriales, todos ellos acceden al estriado ventral por distintas rutas. Las hipótesis actuales sugieren que las propiedades hedónicas de las diversas recompensas son codificadas en todo caso en el estriado ventral, y por extensión en sus proyecciones sobre el pálido (Berridge, 2003), si bien deben existir microcircuitos específicos dentro de este continuo para cada tipo de recompensa, lo cual explicaría tanto el descubrimiento de *puntos calientes* para el sabor dulce (Peciña y Berridge, 2005) como los registros electrofisiológicos específicos de recompensa de neuronas individuales (Carelli *et al.*, 2000). Esta hipótesis sugiere la existencia, en el estriado ventral, de un mosaico de territorios, cada uno

de los cuales participaría en el procesado del valor recompensante de un estímulo reforzante natural. Aunque todo el estriado ventral muestra un esquema de organización similar, cada territorio presenta particularidades que determinan los distintos mecanismos neuroquímicos específicos de cada reforzante natural.

5.6 UNA PERSPECTIVA EVOLUTIVA

Para concluir la discusión general de los resultados expuestos a lo largo de esta tesis doctoral, aprovecharemos la base en anatomía comparada del grupo de investigación en el que se encuadra nuestro trabajo. Intentaremos demostrar cómo una perspectiva evolutiva y comparada nos resulta muy útil a la hora de comprender la función de las vías neurales que controlan los procesos de refuerzo inducido por feromonas, y cómo de hecho esta perspectiva es indispensable para interpretar correctamente la agrupación de diversos núcleos cerebrales como unidades funcionales (como en el caso de los núcleos que componen la amígdala).

5.6.1 El olfatoestriado de mamíferos

Probablemente el resultado más importante que hemos obtenido en este trabajo sea el descubrimiento de que una lesión de la zona circundante al islote de Calleja magno, que comprende parte de la zona de proyección de los núcleos amigdalinos que reciben la inervación directa de los bulbos olfativos, elimina la atracción innata de las hembras de ratón por feromonas de macho.

Los islotes de Calleja, pese a sus llamativas características que los diferencian claramente del estriado ventral adyacente, han recibido muy poca atención, lo cual se ha traducido en que, a día de hoy, no existan apenas experimentos que de manera inequívoca les asignen una función. De entre las hipótesis existentes sobre el posible papel de los islotes de Calleja, nos fijamos en las apuntadas más de dos décadas atrás por Fallon

y colaboradores (1983) y por Talbot y colaboradores (1989), que basándose en sus características hodológicas y neuroquímicas les asignaron un posible papel en el comportamiento sexual, hipótesis que nuestro resultado parece refrendar. Pero no sólo, ya que los islotes de Calleja podrían estar implicados en el amplio rango de comportamientos desencadenados por feromonas.

Desde una perspectiva evolutiva, los islotes de Calleja se encuentran en una gran variedad de mamíferos, incluyendo la especie humana (Meyer *et al.*, 1989), y aunque no han sido descritos en otros vertebrados, recientemente Martínez-Marcos y colaboradores (Úbeda-Bañón *et al.*, 2008) han propuesto que estas especializaciones del telencéfalo de mamíferos deben corresponder a una zona especial del estriado ventral de reptiles, el *olfatoestriado*, descrito por primera vez por Durward (1930) y retomado por Lanuza y Halpern (1997) para describir esta zona en serpientes, estructura que también se encuentra en lagartijas (Novejarque *et al.*, 2004; Novejarque, 2007). Tanto las características hodológicas como neuroquímicas de ambas estructuras apoyan fuertemente esta homología. Así, el olfatoestriado de reptiles recibe sus aferencias desde el núcleo esférico, el homólogo en reptiles de la amígdala posteromedial cortical de los mamíferos (Martínez-García *et al.*, 2002; 2007). Sus patrones de inervación por parte de fibras serotoninérgicas, dopaminérgicas y ricas en NPY son similares en los islotes de Calleja.

En los trabajos pioneros de Kubie y Halpern (1975) y Halpern (1988) se sugirió por primera vez que un estímulo detectado por el órgano vomeronasal (el *extracto de gusano*, es decir, una *alomona*) tenía

propiedades intrínsecamente reforzantes para las serpientes, propiedades que más tarde se propuso podían estar siendo codificadas en el olfatoestriado (Martínez-Marcos *et al.*, 2005a; 2005b). Es más, otra de las funciones del olfatoestriado podría ser la de controlar el mecanismo de *tongue-flick* necesario para la detección e introducción de las señales químicas al órgano vomeronasal (Martínez-Marcos *et al.*, 2001). A este respecto, sería interesante comprobar los efectos de la eliminación de los islotes de Calleja sobre el mecanismo de bombeo vomeronasal de roedores (Meredith y O'Connell, 1979).

En resumen, el descubrimiento de que una lesión que afecta a los islotes de Calleja elimina el comportamiento de atracción innata por feromonas de macho en hembras de ratón, desde la perspectiva evolutiva que los propone homólogos del olfatoestriado de reptiles, inaugura un interesante campo de estudio basado en la investigación de estas estructuras del estriado ventral como especializaciones que codifican el valor reforzante de estímulos de carácter vomeronasal también en mamíferos, ya se trate de feromonas sexuales o alomonas provenientes de presas. Experimentos en reptiles análogos al expuesto aquí validarían esta hipótesis, y proporcionarían la clave para comprender la evolución conservada de una estructura clave para la supervivencia de las especies.

5.6.2 ¿Qué es la amígdala?

En la Introducción General comentamos la posibilidad de que la amígdala fuese la estructura clave para el refuerzo inducido por feromonas, y terminaremos esta tesis preguntándonos qué aporta el trabajo que hemos desarrollado al avance en la comprensión de esta

compleja e indispensable estructura. Vimos al empezar nuestra exposición cómo el año en que defenderemos esta tesis doctoral se cumple una década desde el provocativo artículo de Swanson y Petrovich (1998), cuestionándose el concepto de amígdala como estructura con una función propia.

La identificación de las feromonas como estímulos reforzantes nos proporciona un modelo original y ventajoso para estudiar el papel de la amígdala en el refuerzo. De hecho, nuestros datos indican que la función quimiosensorial de la amígdala es inseparable de su función emocional (Lanuza *et al.*, 2008), dado que, a través de la amígdala y sus proyecciones los estímulos vomeronasales innatamente atractivos (o aversivos y amenazantes) actúan como estímulos incondicionados para el etiquetado de otros estímulos, tanto de naturaleza química como de otras modalidades sensoriales.

Así, frente a los cuatro sistemas funcionales en que Swanson y Petrovich (1998) dividieron la amígdala, Martínez-García y colaboradores (2006; 2008) propusieron la existencia de dos sistemas funcionales en la amígdala de los vertebrados que se encuentran profusamente interconectados entre sí (Figura 42). Por un lado, el sistema amigdalino basolateral-central recibe principalmente estímulos gustativos y viscerosceptivos a nivel subpalial, además de todo tipo de estímulos no quimiosensoriales a nivel palial. Además, el sistema amigdalino basolateral-central controla la expresión de emociones básicas de miedo/ansiedad a través de sus proyecciones descendientes al tronco del encéfalo. Por otro lado, la división amigdalina medial se encuentra dominada por la información quimiosensorial, y mediante sus

proyecciones al hipotálamo, controla la expresión de los comportamientos socio-sexuales específicos de especie. Estrechamente relacionada con la división medial y dominada igualmente por aferencias quimiosensoriales, la división cortical puede controlar las propiedades reforzantes de los estímulos químicos mediante sus proyecciones al estriado ventral. De la misma manera, la división basolateral inerva el estriado ventral, y esta interacción se ha considerado desde hace tiempo como clave en los sistemas del refuerzo (Everitt *et al.*, 1989, 1991, 1999).

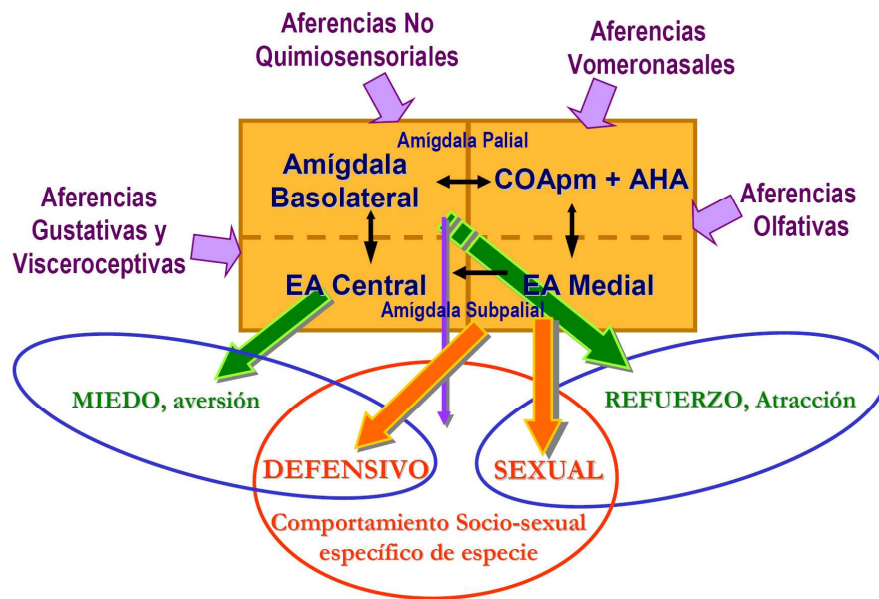


Figura 42. La amígdala como sistema funcional.

Siguiendo la propuesta de Martínez-García y colaboradores (2006; 2008), la amígdala está constituida por dos sistemas cuyas funciones se encuentran estrechamente relacionadas, constituyendo por tanto un verdadero sistema funcional. Imagen adaptada de Martínez-García *et al.*, 2008 y cedida amablemente por Amparo Novejarque.

En este contexto, nosotros pensamos que los comportamientos específicos de especie no pueden ser disociados de las emociones básicas, a pesar de que sean controlados por los diversos núcleos de la

amígdala. Así, los comportamientos defensivos cursan con miedo/ansiedad mientras que el comportamiento sexual y los estímulos sexuales tienen un carácter apetitivo y reforzante. Por lo tanto, las respuestas comportamentales y emocionales deben ser coordinadas mediante las interconexiones de ambos sistemas amigdalinos. La conservación de este patrón en los vertebrados amniotas nos demuestra que la evolución conjunta de los diversos núcleos de la amígdala es esencial para la supervivencia y el éxito reproductivo de las especies, y por lo tanto la amígdala debe ser considerada como una unidad funcional real.

El estudio de los comportamientos apetitivos provocados por las feromonas sexuales en hembras de ratón nos ha proporcionado, y nos proporcionará en el futuro, un modelo novedoso y muy útil para estudiar la interrelación del papel quimiosensorial de la amígdala con su esencial función como centro emocional.

6. CONCLUSIONES

1. Las propiedades atractivas innatas de las feromonas sexuales, que interpretamos como propiedades hedónicas primarias, no se encuentran mediadas por la dopamina, sino, por el contrario, pueden ser inhibidas por agonistas del receptor D1.
2. Al contrario de lo que sucede con la preferencia por otro estímulo reforzante natural, el sabor dulce de la sacarosa, el tratamiento con un antagonista opioidérgico no afecta a la preferencia por feromonas de macho.
3. Los opiáceos inhiben la preferencia por feromonas de macho, actuando sobre los receptores μ . Evidencias anatómicas y experimentos comportamentales existentes en la bibliografía sugieren

que este efecto se debe a su acción sobre la amígdala posteromedial cortical.

4. El óxido nítrico participa en la señalización de las propiedades atractivas innatas de las feromonas de macho, dado que un tratamiento farmacológico que inhibe su síntesis elimina la preferencia de las hembras de ratón por las mismas. Este efecto no se debe a un déficit olfativo, ya que las hembras son capaces de detectar y discriminar la orina de macho en un test estándar de función olfativa.
5. Aunque la distribución de aferencias y receptores para la serotonina sugiere la participación del sistema serotoninérgico en la atracción por feromonas masculinas, nuestros resultados no permiten conclusiones claras acerca de su papel, ya que tanto el antagonista como el agonista empleado eliminaron la preferencia incondicionada. Sin embargo, el agonista lo hizo sin afectar de manera global al comportamiento del animal, mientras que el antagonista sólo eliminó la respuesta innata hacia las feromonas sexuales masculinas a dosis que provocaban signos de sedación en los animales.
6. Los estudios anatómicos previos, junto con los presentes estudios farmacológicos, sugieren que la zona del estriado ventro-medial que comprende los islotes de Calleja, incluido el magno, y el tubérculo olfativo, es clave para el comportamiento de preferencia comportamental de las hembras de ratón por feromonas de macho. El experimento utilizando hembras con lesiones electrolíticas de esta zona confirma esta hipótesis, ya que los sujetos que portan esta lesión no expresan preferencia por las feromonas de macho.

7. La adquisición de una preferencia de lugar condicionada utilizando feromonas de macho como estímulo reforzante no pudo impedirse ni con antagonistas dopaminérgicos ni con un antagonista general de opiáceos, lo cual deja abierta la investigación acerca de los núcleos y mecanismos que participan en este tipo de aprendizaje.
8. En conjunto, todos estos resultados comienzan a definir la circuitería neuroquímica que controla los comportamientos guiados por feromonas sexuales en hembras de ratón. En concreto, esta vía comprende las proyecciones glutamatérgicas desde el bulbo olfativo accesorio a la amígdala vomeronasal y desde ésta al estriado ventromedial, incluyendo los islotes de Calleja mediales y el magno, y el tubérculo olfativo medial.

BIBLIOGRAFÍA

- Accili D., Fishburn C.S., Drago J., Steiner H., Lachowicz J.E., Park B.H., Gauda E.B., Lee E.J., Cool M.H., Sibley D.R., Gerfen C.R., Westphal H., Fuchs S. (1996) A targeted mutation of the D3 dopamine receptor gene is associated with hyperactivity in mice. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences U.S.A.* 93:1945-9.
- Acosta-Martinez M., Etgen A. M. (2002). Activation of mu-opioid receptors inhibits lordosis behavior in estrogen and progesterone-primed female rats. *Hormones and Behavior.* 41:88-100.
- Agmo A. (1999) Sexual motivation--an inquiry into events determining the occurrence of sexual behavior. *Behavior & Brain Research.* 105:129-50.
- Agmo A., Berenfeld R. (1990) Reinforcing properties of ejaculation in the male rat: role of opioids and dopamine. *Behavioral Neuroscience.* 104:177-82

- Agmo A., Galvan A., Talamantes B. (1995) Reward and reinforcement produced by drinking sucrose: two processes that may depend on different neurotransmitters. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 52:403-414.
- Argiolas A. (1999) Neuropeptides and sexual behaviour. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 23:1127-42.
- Arnold J.C., Toppo A.N., Mallet P.E., Hunt G.E., McGregor I.S. (2001) The distribution of cannabinoid-induced Fos expression in rat brain: differences between the Lewis and Wistar strain. *Brain Research*. 921:240-55.
- Azmitia E.C. (2001) Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Research Bulletin*. 56:413-24.
- Baker H. (1986) Species differences in the distribution of substance P and tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology*. 252:206-26.
- Barbano M.F., Cador M. (2007) Opioids for hedonic experience and dopamine to get ready for it. *Psychopharmacology (Berl)*. 191:497-506.
- Bardo M.T., Donohew R.L., Harrington N.G. (1996) Psychobiology of novelty seeking and drug seeking behavior. *Behavioural Brain Research*. 77: 23-43.
- Barik S., de Beaufort R. (1998) Hypothermic effects of dopamine D3 receptor agonists in the island of Calleja Magna. Potentiation by D1 activation. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*. 60:313-9.
- Barnes N.M., Sharp T. (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*. 38:1083-152.
- Baum M.J., Keverne E.B. (2002) Sex difference in attraction thresholds for volatile odors from male and estrous female mouse urine. *Hormones & Behavior*. 41:213-219.
- Baxi K.N., Dorries K.M., Eisthen H.L. (2006) Is the vomeronasal system really specialized for detecting pheromones? *Trends in Neuroscience*. 29:1-7.
- Baxter M.G., Murray E.A. (2002) The amygdala and reward. *Nature Reviews of Neuroscience*. 3:563-73.

- Beauchamp G.K., Martin I.G., Wellington J.L., Wysocki C.J. (1983) The accessory olfactory system: role in maintenance of chemoinvestigatory behavior. *Chemical signals in vertebrates III. Muller-Schwarze D, Silverstein RM, editors. New York: Plenum Press.* 73–86.
- Beauchamp G.K., Wysocki C.J., Wellington J.L. (1985) Extinction of response to urine odor as a consequence of vomeronasal organ removal in male guinea pigs. *Behavioral Neuroscience.* 99:950-5.
- Becker A., Grecksch G., Kraus J., Loh H.H., Schroeder H., Holtt V. (2002). Rewarding effects of ethanol and cocaine in mu opioid receptor-deficient mice. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology.* 365: 296–302.
- Berlyne D.E. (1950) Novelty and curiosity as determinants of exploratory behaviour. *British Journal of Psychology.* 41:68–80.
- Berridge K.C. (2000) Measuring hedonic impact in animals and infants: microstructure of affective taste reactivity patterns. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* 24:173-98.
- Berridge K.C. (2003) Pleasures of the brain. *Brain & Cognition.* 52:106-28.
- Berridge K.C., Robinson, T.E. (1998) What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience?. *Brain Research Reviews.* 28:309-369.
- Berridge K.C., Robinson, T.E. (2003) Parsing reward. *Trends in Neuroscience.* 26:507-513.
- Bevins R.A., Besheer J., Palmatier M.I., Jensen H.C., Pickett K.S., Eures S. (2002) Novel-object place conditioning: behavioral and dopaminergic processes in expression of novelty reward. *Behavioural Brain Research.* 129:41–50.
- Björklund A., Lindvall O. (1984) Dopamine containing systems in the CNS. *Handbook of Chemical Neuroanatomy, Vol. 2. Classical Transmitters in the CNS, Part 1. Elsevier Science Publishers.* 55-122
- Blaustein J.D., Erskine M.S. (2002) Feminine sexual behavior: Cellular integration of hormonal and afferent information in the rodent brain. *Hormones Brain and*

- Behavior*. Pfaff, Arnold, Etgen, Fabrbach, and Rabin, editors. Academic Press. 139-214.
- Bodnar R.J., Klein G.E. (2006) Endogenous opiates and behavior: 2005. *Peptides*. 27:3391-478.
- Bohme G.A., Bon C., Lemaire M., Reibaud M., Piot O., Stutzmann J.M., Doble A., Blanchard J.C. (1993) Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*. 90:9191-4.
- Boolell M., Allen M.J., Ballard S.A., Gepi-Attee S., Muirhead G.J., Naylor A.M., Osterloh I.H., Gingell C. (1996) Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. *International Journal of Impotence Research*. 8:47-52.
- Boschat C., Pélofi C., Randin O., Roppolo D., Lüscher C., Broillet M.C., Rodriguez I. (2002) Pheromone detection mediated by a V1r vomeronasal receptor. *Nature Neuroscience*. 5:1261-2.
- Brain P.F., Bowden N.J. (1979) Sex steroid control of intermale fighting in mice. *Current Developments in Psychopharmacology*. 5:403-65.
- Bredt D.S., Hwang P.M., Snyder S.H. (1990) Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*. 347:768-70.
- Breer H., Shepherd G.M. (1993) Implications of the NO/cGMP system for olfaction. *Trends in Neuroscience*. 16:5-9.
- Brenman J.E., Bredt D.S. (1997) Synaptic signaling by nitric oxide. *Current Opinion in Neurobiology*. 7:374-8.
- Brennan P., Kaba H., Keverne E.B. (1990) Olfactory recognition: a simple memory system. *Science*. 250:1223-6.
- Brennan P.A., Kendrick K.M., Keverne E.B. (1995) Neurotransmitter release in the accessory olfactory bulb during and after the formation of an olfactory memory in mice. *Neuroscience*. 69:1075-86.
- Brennan P.A., Kishimoto J. (1993) Local inhibition of nitric oxide synthase activity in the accessory

- olfactory bulb does not prevent the formation of an olfactory memory in mice. *Brain Research*. 619:306-12.
- Broekkamp C.L., Rijk H.W., Joly-Gelouin D., Lloyd K.L. (1986) Major tranquillizers can be distinguished from minor tranquillizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice. *European Journal of Pharmacology*. 126:223-9.
- Brog J.S., Salyapongse A., Deutch A. Y., Zahm D.S. (1993) The patterns of afferent innervation of the core and shell in the "accumbens" part of the rat ventral striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. *Journal of Comparative Neurology*. 338:255-278.
- Bruce H. (1959) An exteroceptive block to pregnancy in the mouse. *Nature*. 184:105.
- Burdach K.F. (1819-1822) Vom Baue und Leben des Gehirns, Leipzig.
- Cador M., Robbins T.W., Everitt B.J. (1989) Involvement of the amygdala in stimulus-reward associations: interaction with the ventral striatum. *Neuroscience*. 30:77-86.
- Caffé A.R., van Leeuwen F.W., Luiten P.G. (1987) Vasopressin cells in the medial amygdala of the rat project to the lateral septum and ventral hippocampus. *Journal of Comparative Neurology*. 261:237-52.
- Calaresu F.R., Zhang J., Chitravanshi V.C., McKittrick D.J. (1994) Cardiovascular and single unit responses elicited by stimulation of the islands of Calleja and by changes in arterial pressure. *Brain Research*. 655:45-50.
- Cannon C.M., Palmiter R.D. (2003) Reward without dopamine. *The Journal of Neuroscience*. 23:10827-10831.
- Carelli R.M., Ijames S.G., Crumling A.J. (2000) Evidence that separate neural circuits in the nucleus accumbens encode cocaine versus "natural" (water and food) reward. *The Journal of Neuroscience*, 20:4255-66.
- Cavaggioni A., Mucignat-Caretta C. (2000) Major urinary proteins, alpha(2U)-globulins and aphrodisin. *Biochimica Biophysica Acta*. 1482:218-28.

- Centonze D., Pisani A., Bonsi P., Giacomini P., Bernardi G., Calabresi P. (2001) Stimulation of nitric oxide-cGMP pathway excites striatal cholinergic interneurons via protein kinase G activation. *The Journal of Neuroscience*. 21:1393-400.
- Chamero P., Marton T.F., Logan D.W., Flanagan K., Cruz J.R., Saghatelyan A., Cravatt B.F., Stowers L. (2007) Identification of protein pheromones that promote aggressive behaviour. *Nature*. 450:899-902.
- Chanrion B., Mannoury la Cour C., Bertaso F., Lerner-Natoli M., Freissmuth M., Millan M.J., Bockaert J., Marin P. (2007) Physical interaction between the serotonin transporter and neuronal nitric oxide synthase underlies reciprocal modulation of their activity. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences U.S.A.* 104:8119-24.
- Charara A., Grace A.A. (2003) Dopamine receptor subtypes selectively modulate excitatory afferents from the hippocampus and amygdala to rat nucleus accumbens neurons. *Neuropsychopharmacology*. 28:1412-21.
- Chiavegatto S., Dawson V.L., Mamounas L.A., Koliatsos V.E., Dawson T.M., Nelson R.J. (2001) Brain serotonin dysfunction accounts for aggression in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences U.S.A.* 98:1277-81.
- Chiavegatto S., Nelson R.J. (2003) Interaction of nitric oxide and serotonin in aggressive behavior. *Hormones & Behavior*. 44:233-41.
- Choi G.B., Dong H.W., Murphy A.J., Valenzuela D.M., Yancopoulos G.D., Swanson L.W., Anderson D.J. (2005) Lhx6 delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus. *Neuron*. 46:647-60.
- Collmann C., Carlsson M.A., Hansson B.S., Nighorn A. (2004) Odorant-evoked nitric oxide signals in the antennal lobe of *Manduca sexta*. *Journal of Neuroscience*. 24:6070-7.
- Compaan J.C., Buijs R.M., Pool C.W., De Ruiter A.J., Koolhaas J.M. (1993) Differential lateral septal vasopressin innervation in

- aggressive and nonaggressive male mice. *Brain Research Bulletin*. 30:1-6.
- Coppola D.M., O'Connell R.J. (1988) Are pheromones their own reward? *Physiology & Behavior*. 44:811-6.
- Corbett D., Wise R.A. (1979) Intracranial self-stimulation in relation to the ascending noradrenergic fiber systems of the pontine tegmentum and caudal midbrain: a moveable electrode mapping study. *Brain Research*. 177:423-36.
- Corbett D., Wise R.A. (1980) Intracranial self-stimulation in relation to the ascending dopaminergic systems of the midbrain: a moveable electrode mapping study. *Brain Research*. 185:1-15.
- Crespi F., Rossetti Z.L. (2004) Pulse of nitric oxide release in response to activation of N-methyl-D-aspartate receptors in the rat striatum: rapid desensitization, inhibition by receptor antagonists, and potentiation by glycine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 309:462-8.
- Crespo C., Gracia-Llanes F.J., Blasco-Ibáñez J.M., Gutiérrez-Mecinas M., Marqués-Marí A.I., Martínez-Guijarro F.J. (2003) Nitric oxide synthase containing periglomerular cells are GABAergic in the rat olfactory bulb. *Neuroscience Letters*. 349:151-4.
- Crowder W. F., Hutto C. W. Jr., (1992) Operant place conditioning measures examined using two nondrug reinforcers. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*. 41:817-824.
- Crowley W.R., Feder H.H., Morin L.P. (1976) Role of monoamines in sexual behavior of the female guinea pig. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*. 4:67-71.
- Cyr M., Landry M., Di Paolo T. (2000) Modulation by estrogen-receptor directed drugs of 5-hydroxytryptamine-2A receptors in rat brain. *Neuropsychopharmacology*. 23:69-78.
- Czech D.A. (1999) A nitric oxide synthase inhibitor, L-NAME, attenuates saccharin drinking in a two-choice test in water-deprived rats. *Physiology & Behavior*. 67:161-5.

- Czirr S. A., Reid L. D. (1986) Demonstrating morphine's potentiating effects on sucrose-intake. *Brain Research Bulletin*. 17:639-642.
- Dahlstrom A., Fuxe K. (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*. 20:398-9.
- Dawson T.M., Bredt D.S., Fotuhi M., Hwang P.M., Snyder S.H. (1991) Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 88:7797-801.
- Deacon R.M. (2006) Digging and marble burying in mice: simple methods for in vivo identification of biological impacts. *Nature Protocols*. 1:122-4.
- Del Punta, K., Leinders-Zufall, T., Rodriguez, I., Jukam D., Wysocki, C.J., Ogawa, S., Zufall, F., Mombaerts, P. (2002) Deficient pheromone responses in mice lacking a cluster of vomeronasal receptor genes. *Nature*. 419:70-74.
- Demas G.E., Eliasson M.J., Dawson T.M., Dawson V.L., Kriegsfeld L.J., Nelson R.J., Snyder S.H. (1997) Inhibition of neuronal nitric oxide synthase increases aggressive behavior in mice. *Molecular Medicine*. 3:610-6.
- Demas G.E., Kriegsfeld L.J., Blackshaw S., Huang P., Gammie S.C., Nelson R.J., Snyder S.H. (1999) Elimination of aggressive behavior in male mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *The Journal of Neuroscience*. 19:RC30.
- de Olmos J.S., Heimer L. (1999) The concepts of the ventral striatopallidal system and extended amygdala. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 877:1-32.
- de Vente J., Hani L., Steinbusch H.E., Steinbusch H.W. (2001) The three dimensional structure of the islands of Calleja: a single heterogenous cell complex. *Neuroreport*. 12:565-8.
- de Vente J., Hopkins D.A., Markerink-van Ittersum M., Steinbusch H.W. (1998) Nitric oxide-mediated cGMP production in the islands of Calleja in the rat. *Brain Research*. 789:175-8.

- deVries G.J., Buijs R.M., Swaab D.F. (1981) Ontogeny of the vasopressinergic neurons of the suprachiasmatic nucleus and their extrahypothalamic projections in the rat brain--presence of a sex difference in the lateral septum. *Brain Research*. 218:67-78.
- deVries G.J., Buijs R.M., Van Leeuwen F.W., Caffé A.R., Swaab D.F. (1985) The vasopressinergic innervation of the brain in normal and castrated rats. *Journal of Comparative Neurology*. 233:236-54.
- Díaz J., Lévesque D., Lammers C.H., Griffon N., Martres M.P., Schwartz J.C., Sokoloff P. (1995) Phenotypical characterization of neurons expressing the dopamine D3 receptor in the rat brain. *Neuroscience*. 65:731-45.
- Dielenberg R.A., McGregor I.S. (1999) Habituation of the hiding response to cat odor in rats (*Rattus norvegicus*). *The Journal of Comparative Psychology*. 113:376-87.
- Dixon A.K., Mackintosh J. H. (1971) Effects of female urine upon the social behaviour of adult male mice. *Animal Behavior*. 19:138-140.
- Doty R.L., Ferguson-Segall M. (1987) Odor detection performance of rats following d-amphetamine treatment: a signal detection analysis. *Psychopharmacology (Berl)*. 93:87-93.
- Drickamer L.C. (1989) Odor preferences of wild stock female house mice (*Mus domesticus*) tested at three ages using urine and other cues from conspecific males and females. *Journal of Chemical Ecology*. 15:1971-1987
- Dudley C.A., Moss R.L. (1999) Activation of an anatomically distinct subpopulation of accessory olfactory bulb neurons by chemosensory stimulation. *Neuroscience*. 91:1549-56.
- Dulac C., Axel R. (1995) A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell*. 83:195-206.
- Dulac C., Torello A.T. (2003) Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. *Nature Reviews of Neuroscience*. 4:551-562.
- Durward A. (1930) The cell masses in the forebrain of *Sphenodon punctatum*. *Journal of Anatomy*. 65:8

- Duxon M.S., Flanigan T.P., Reavley A.C., Baxter G.S., Blackburn T.P., Fone K.C. (1997) Evidence for the expression of the 5-hydroxytryptamine_{2B} receptor protein in the rat central nervous system. *Neuroscience*. 76, 323–329.
- Eklund A.C. (1998) Use of the MHC for mate choice in wild house mice (*Mus domesticus*). *Genetica*. 104:245-8.
- Ellingsen E., Agmo A. (2004) Sexual-incentive motivation and paced sexual behavior in female rats after treatment with drugs modifying dopaminergic neurotransmission. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*. 77:431-445.
- Elmer G.I., Pieper J.O., Rubinstein M., Low M.J., Grandy D.K., Wise R.A. (2002) Failure of intravenous morphine to serve as an effective instrumental reinforcer in dopamine D2 receptor knock-out mice. *The Journal of Neuroscience*. 22:RC224.
- Everitt B.J., Fuxe K., Hokfelt T. (1974) Inhibitory role of dopamine and 5-hydroxytryptamine in the sexual behaviour of female rats. *European Journal of Pharmacology*. 29:187-191.
- Everitt B.J., Cadore M., Robbins T.W. (1989) Interactions between the amygdala and ventral striatum in stimulus-reward associations: studies using a second-order schedule of sexual reinforcement. *Neuroscience*. 30:63-75.
- Everitt B.J., Morris K.A., O'Brien A., Robbins T.W. (1991) The basolateral amygdala-ventral striatal system and conditioned place preference: further evidence of limbic-striatal interactions underlying reward-related processes. *Neuroscience*, 42:1-18.
- Everitt B.J., Parkinson J.A., Olmstead M.C., Arroyo M., Robledo P., Robbins T.W. (1999) Associative processes in addiction and reward. The role of amygdala-ventral striatal subsystems. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 877:412-38.
- Everts H.G., De Ruiter A.J., Koolhaas J.M. (1997) Differential lateral septal vasopressin in wild-type rats: correlation with aggression. *Hormones & Behavior*. 31:136-44.

- Everts H.G., Koolhaas J.M. (1997) Lateral septal vasopressin in rats: role in social and object recognition? *Brain Research*. 760:1-7.
- Everts H.G., Koolhaas J.M. (1999) Differential modulation of lateral septal vasopressin receptor blockade in spatial learning, social recognition, and anxiety-related behaviors in rats. *Behavior & Brain Research*. 99:7-16.
- Eyny Y.S., Horvitz J.C. (2003) Opposing roles of D1 and D2 receptors in appetitive conditioning. *The Journal of Neuroscience*. 23:1584-7.
- Fabian I., Ableitner A. (1995) Brain sites involved in mu-opioid receptor-mediated actions: a 2-deoxyglucose study. *Brain Research*. 697:205-15.
- Fallon J.H. (1983) The islands of Calleja complex of rat basal forebrain II: connections of medium and large sized cells. *Brain Research Bulletin*. 10:775-93.
- Fallon J.H., Leslie F.M. (1986) Distribution of dynorphin and enkephalin peptides in the rat brain. *Journal of Comparative Neurology*. 249:293-336.
- Fallon J.H., Loughlin S.E., Ribak C.E. (1983) The islands of Calleja complex of rat basal forebrain. III. Histochemical evidence for a striatopallidal system. *Journal of Comparative Neurology*. 218:91-120.
- Fallon J.H., Riley J.N., Sipe J.C., Moore R.Y. (1978) The islands of Calleja: organization and connections. *Journal of Comparative Neurology*. 181:375-95.
- Ferguson J.N., Aldag J.M., Insel T.R., Young L.J. (2001) Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse. *The Journal of Neuroscience*. 21:8278-85.
- Ferguson J.N., Young L.J., Hearn E.F., Matzuk M.M., Insel T.R., Winslow J.T. (2000) Social amnesia in mice lacking the oxytocin gene. *Nature Genetics*. 25:284-8.
- Ferris C.F., Stolberg T., Delville Y. (1999) Serotonin regulation of aggressive behavior in male golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Behavioral Neuroscience*. 113:804-15.
- Franklin B.J., Paxinos G. (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic coordinates*. Academic Press, 2nd Ed.

- French S.J., Totterdell S. (2003) Individual nucleus accumbens-projection neurons receive both basolateral amygdala and ventral subicular afferents in rats. *Neuroscience*.119:19-31.
- Frohlich P.F., Meston C.M. (2000) Evidence that serotonin affects female sexual functioning via peripheral mechanisms. *Physiology & Behavior*. 71:383-93.
- Gackenhaimer S.L., Schober D.A., Gehlert D.R. (2001) Characterization of neuropeptide Y Y1-like and Y2-like receptor subtypes in the mouse brain. *Peptides*. 22:335-41.
- Gammie S.C., Nelson R.J. (1999) Maternal aggression is reduced in neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *The Journal of Neuroscience*. 19:8027-35.
- García H.P., Paredes R.G. (2004) Dopamine antagonists do not block conditioned place preference induced by paced mating behavior in female rats. *Behavioral Neuroscience*. 118:356-364.
- García-López M., Abellán A., Legaz I., Rubenstein J.L., Puelles L., Medina L. (2008) Histogenetic compartments of the mouse centromedial and extended amygdala based on gene expression patterns during development. *Journal of Comparative Neurology*. 506:46-74.
- Garthwaite J., Charles S.L., Chess-Williams R. (1988) Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*. 336: 385-8.
- Gelperin A. (1994) Nitric oxide mediates network oscillations of olfactory interneurons in a terrestrial mollusc. *Nature*. 369:61-3.
- Gelperin A., Flores J., Raccuia-Behling F., Cooke I.R. (2000) Nitric oxide and carbon monoxide modulate oscillations of olfactory interneurons in a terrestrial mollusk. *Journal of Neurophysiology*. 83:116-27.
- Gerfen C.R., Engber T.M., Mahan L.C., Susel Z., Chase T.N., Monsma F.J. Jr., Sibley D.R. (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and

- striatopallidal neurons. *Science*. 250:1429-32.
- Gerfen C.R., Young W.S. III (1988) Distribution of striatonigral and striatopallidal peptidergic neurons in both patch and matrix compartments: an in situ hybridization histochemistry and fluorescent retrograde tracing study. *Brain Research*, 460:161-167
- Gerrits M.A., Patkina N., Zvartau E.E., van Ree J.M. (1995) Opioid blockade attenuates acquisition and expression of cocaine-induced place preference conditioning in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 119:92-98
- Geter-Douglass B., Katz J.L., Alling K., Acri J.B., Witkin J.M. (1997) Characterization of unconditioned behavioral effects of dopamine D3/D2 receptor agonists. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 283:7-15.
- Giacchino J.L., Henriksen S.J. (1998) Opioid effects on activation of neurons in the medial prefrontal cortex. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 22:1157-78.
- Gonzalez M.I., Greengrass P., Russell M., Wilson C.A. (1997) Comparison of serotonin receptor numbers and activity in specific hypothalamic areas of sexually active and inactive female rats. *Neuroendocrinology*. 66:384-92.
- Gonzalez M.I., Patmore L., Wilson C.A. (1996) Effect of delequamine (RS15385) on female sexual behaviour in the rat. *European Journal of Pharmacology*. 312:1-6.
- Goodwin T.E., Eggert M.S., House S.J., Weddell M.E., Schulte B.A., Rasmussen L.E. (2006) Insect pheromones and precursors in female African elephant urine. *Journal of Chemical Ecology*. 32:1849-53.
- Grierson J.P., James M.D., Pearson J.R., Wilson C.A. (1988) The effect of selective D1 and D2 dopaminergic agents on sexual receptivity in the female rat. *Neuropharmacology*. 27:181-9.
- Grill H.J., Norgren R. (1978) The taste reactivity test. I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. *Brain Research*. 143:263-79.

- Guevara-Guzman R., Emson P.C., Kendrick K.M. (1994) Modulation of in vivo striatal transmitter release by nitric oxide and cyclic GMP. *Journal of Neurochemistry*. 62:807-10.
- Gutiérrez-Mecinas M., Crespo C., Blasco-Ibáñez J.M., Gracia-Llanes F.J., Marqués-Marí A.I., Martínez-Guijarro F.J. (2005) Soluble guanylyl cyclase appears in a specific subset of periglomerular cells in the olfactory bulb. *European Journal of Neuroscience*. 21:1443-8.
- Gyertyan I. (1995) Analysis of the marble burying response: marbles serve to measure digging rather than evoke burying. *Behavioral Pharmacology*. 6:24-31.
- Halliwel J.V., Horne A.L. (1998) Evidence for enhancement of gap junctional coupling between rat island of Calleja granule cells in vitro by the activation of dopamine D3 receptors. *Journal of Physiology*. 506:175-94.
- Halpern M. (1987) The organization and function of the vomeronasal system. *Annual Reviews of Neuroscience*. 10, 325-362
- Halpern M. (1988) Vomeronasal system functions: role in mediating the reinforcing properties of chemical stimuli. *The Forebrain of Reptiles*. *Schwerdtfeger, Smeets, Eds.* 142-150.
- Halpern M., Martínez-Marcos A. (2003) Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Progress in Neurobiology*. 70:245-318.
- Hansen S., Harthorn C., Wallin E., Löfberg L., Svensson K. (1991) Mesotelencephalic dopamine system and reproductive behavior in the female rat: effects of ventral tegmental 6-hydroxydopamine lesions on maternal and sexual responsiveness. *Behavioral Neuroscience*. 105:588-98.
- Harding A., Paxinos G., Halliday G. (2004) Serotonin and Tachykinin Systems. En: *The Rat Nervous System*. Ed. George Paxinos, Academic Press, 3ª Ed. 1205-1256.
- Heidbreder C.A., Gardner E.L., Xi Z.X., Thanos P.K., Mugnaini M., Hagan J.J., Ashby C.R. Jr. (2005) The role of central dopamine D3 receptors in drug addiction: a review of pharmacological

- evidence. *Brain Research Reviews*. 49:77-105.
- Heisler L.K., Cowley M.A., Kishi T., Tecott L.H., Fan W., Low M.J., Smart J.L., Rubinstein M., Tatro J.B., Zigman J.M., Cone R.D., Elmquist J.K. (2003) Central serotonin and melanocortin pathways regulating energy homeostasis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 994:169-74.
- Henry D.J., Wise R.A., Rompre P.P., White F.J. (1992) Acute depolarization block of A10 dopamine neurons: interactions of morphine with dopamine antagonists. *Brain Research*. 596:231-7.
- Herkenham M., Pert C.B. (1980) In vitro autoradiography of opiate receptors in rat brain suggests loci of "opiate" pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 77:5532-6.
- Herrada G., Dulac C. (1997) A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution. *Cell*. 90:763-73.
- Herrick C.J. (1921) The connections of the vomeronasal nerve, accessory olfactory bulb and amygdala in amphibia. *Journal of Comparative Neurology*. 33:213-280.
- Hnasko T.S., Sotak B.N., Palmiter R.D. (2005) Morphine reward in dopamine-deficient mice. *Nature*. 438:854-7.
- Hnasko T.S., Sotak B.N., Palmiter R.D. (2007) Cocaine-conditioned place preference by dopamine-deficient mice is mediated by serotonin. *The Journal of Neuroscience*. 27:12484-8.
- Hope B.T., Michael G.J., Knigge K.M., Vincent S.R. (1991) Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 88:2811-4
- Hoyer D., Clarke D.E., Fozard J.R., Hartig P.R., Martin G.R., Mylecharane E.J., Saxena P.R., Humphrey P.P. (1994) International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacological Reviews*. 46:157-203.

- Hughes R.N. (1965) Food deprivation and locomotor exploration in the white rat. *Animal Behavior*. 13:30-32
- Hurst J.L., Beynon R.J. (2004) Scent wars: the chemobiology of competitive signalling in mice. *Bioessays*. 26:1288-98.
- Hurst J.L., Payne C.E., Nevison C.M., Marie A.D., Humphries R.E., Robertson D.H., Cavaggioni A., Beynon R.J. (2001) Individual recognition in mice mediated by major urinary proteins. *Nature*. 414:631-4.
- Ignarro L.J. (1990) Haem-dependent activation of guanylate cyclase and cyclic GMP formation by endogenous nitric oxide: a unique transduction mechanism for transcellular signaling. *Pharmacology & Toxicology*. 67:1-7.
- Ikemoto S. (2003) Involvement of the olfactory tubercle in cocaine reward: intracranial self-administration studies. *The Journal of Neuroscience*. 23:9305-11.
- Ikemoto S. (2007) Dopamine reward circuitry: Two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Research Reviews*. 56:27-78.
- Ikemoto S., Qin M., Liu Z.H. (2005) The functional divide for primary reinforcement of D-amphetamine lies between the medial and lateral ventral striatum: is the division of the accumbens core, shell, and olfactory tubercle valid? *The Journal of Neuroscience*. 25:5061-5.
- Imaizumi M., Takeda M., Fushiki T. (2000) Effects of oil intake in the conditioned place preference test in mice. *Brain Research*. 870:150-156.
- Inamura K., Kashiwayanagi M. (2000) Inhibition of fos-immunoreactivity in response to urinary pheromones by beta-adrenergic and serotonergic antagonists in the rat accessory olfactory bulb. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 23:1108-10.
- Insel T.R., Hulihan T.J. (1995) A gender-specific mechanism for pair bonding: oxytocin and partner preference formation in monogamous voles. *Behavioral Neuroscience*. 109:782-9.
- Insel T.R., Wang Z.X., Ferris C.F. (1994) Patterns of brain

- vasopressin receptor distribution associated with social organization in microtine rodents. *The Journal of Neuroscience*. 14:5381-92.
- Irvin R.W., Szot P., Dorsa D.M., Potegal M., Ferris C.F. (1990) Vasopressin in the septal area of the golden hamster controls scent marking and grooming. *Physiology & Behavior*. 48:693-9.
- Itzhak Y., Martin J.L. (2000) Blockade of alcohol-induced locomotor sensitization and conditioned place preference in DBA mice by 7-nitroindazole. *Brain Research*. 858:402-7.
- Jacob S., Kinnunen L.H., Metz J., Cooper M., McClintock M.K. (2001) Sustained human chemosignal unconsciously alters brain function. *Neuroreport*. 12:2391-4.
- Jalowiec J.E., Panksepp J., Zolovick A.J., Najam N., Herman B.H. (1981) Opioid modulation of ingestive behavior. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*. 15:477-84.
- Jansson A., Tinner B., Bancila M., Vergé D., Steinbusch H.W., Agnati L.F., Fuxe K. (2001) Relationships of 5-hydroxytryptamine immunoreactive terminal-like varicosities to 5-hydroxytryptamine-2A receptor-immunoreactive neuronal processes in the rat forebrain. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 22:185-203.
- Jemiolo B., Harvey S., Novotny M. (1986) Promotion of the Whitten effect in female mice by synthetic analogs of male urinary constituents. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 83:4576-9.
- Jiang Z.G., North R.A. (1992) Pre- and postsynaptic inhibition by opioids in rat striatum. *The Journal of Neuroscience*. 12:356-61.
- Johnson M.D., Ma P.M. (1993) Localization of NADPH diaphorase activity in monoaminergic neurons of the rat brain. *Journal of Comparative Neurology*. 332:391-406.
- Johnston J.B. (1923) Further contributions to the study of the evolution of the forebrain. *Journal of Comparative Neurology*. 35:337-481.
- Johnston R.E. (1981) Attraction to odors in hamsters: an evaluation

- of methods. *Journal of Comparative & Physiological Psychology*. 95:951-60.
- Joyce J.N. (2001) Dopamine D3 receptor as a therapeutic target for antipsychotic and antiparkinsonian drugs. *Pharmacology & Therapeutics*. 90:231-59.
- Joyce J.N., Gurevich E.V. (1999) D3 receptors and the actions of neuroleptics in the ventral striatopallidal system of schizophrenics. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 877:595-613.
- Kaba H., Keveme E. B. (1988) The effect of microinfusions of drugs into the accessory olfactory bulb on the olfactory block to pregnancy. *Neuroscience*. 25:1007-1011.
- Kalra S.P., Clark J.T., Sahu A., Dube M.G., Kalra P.S. (1988) Control of feeding and sexual behaviors by neuropeptide Y: physiological implications. *Synapse*. 2:254-7
- Kalra S.P., Kalra P.S. (2004) NPY--an endearing journey in search of a neurochemical on/off switch for appetite, sex and reproduction. *Peptides*. 25:465-71.
- Kane F., Coulombe D., Miliareisis E. (1991) Amygdaloid self-stimulation: a movable electrode mapping study. *Behavioral Neuroscience*. 105:926-932.
- Karl T., Lin S., Schwarzer C., Sainsbury A., Couzens M., Wittmann W., Boey D., von Hörsten S., Herzog H. (2004) Y1 receptors regulate aggressive behavior by modulating serotonin pathways. *Proceeding of Natural Academy of Sciences U.S.A.* 101:12742-7.
- Karlson P., Lüscher M. (1959) "Pheromones": A new term for a class of biologically active substances, *Nature*. 183:55-56.
- Kelley A.E., Bakshi V.P., Haber S.N., Steininger T.L., Will M.J., Zhang M. (2002) Opioid modulation of taste hedonics within the ventral striatum. *Physiology & Behavior*. 76:365-77.
- Kempainen S., Jolkkonen E., Pitkänen A. (2002) Projections from the posterior cortical nucleus of the amygdala to the hippocampal formation and parahippocampal region in rat. *Hippocampus*. 12:735-55.

- Kendrick K.M., Guevara-Guzman R., Zorrilla J., Hinton M.R., Broad K.D., Mimack M., Ohkura S. (1997) Formation of olfactory memories mediated by nitric oxide. *Nature*. 388:670-4.
- Kinsley C.H., Morse A.C., Zoumas C., Corl S., Billack B. (1995) Intracerebroventricular infusions of morphine, and blockade with naloxone, modify the olfactory preferences for pup odors in lactating rats. *Brain Research Bulletin*. 37:103-7.
- Kirouac G.J., Pittman Q.J. (1999) Identification of barosensitive neurons in the mediobasal forebrain using juxtacellular labeling. *American Journal of Physiology*. 276:R1766-71.
- Kishimoto J., Keverne E.B., Hardwick J., Emson P.C. (1993) Localization of nitric oxide synthase in the mouse olfactory and vomeronasal system: a histochemical, immunological and in situ hybridization study. *European Journal of Neuroscience*. 5:1684-94.
- Koob G.F., Fray P.J., Iversen S.D. (1978) Self-stimulation at the lateral hypothalamus and locus coeruleus after specific unilateral lesions of the dopamine system. *Brain Research*. 146:123-40.
- Koob G.F., LeMoal M. (2006) *Neurobiology of Addiction*. Academic Press.
- Kornetsky C., Huston-Lyons D., Porrino L.J. (1991) The role of the olfactory tubercle in the effects of cocaine, morphine and brain-stimulation reward. *Brain Research*. 541:75-81.
- Kovach A.G., Szabo C., Benyo Z., Csaki C., Greenberg J.H., Reivich M. (1992) Effects of NG-nitro-L-arginine and L-arginine on regional cerebral blood flow in the cat. *Journal of Physiology*. 449:183-96.
- Krieger N.R., Megill J.R., Sterling P. (1983) Granule cells in the rat olfactory tubercle accumulate ³H-gamma-aminobutyric acid. *Journal of Comparative Neurology*. 215:465-71.
- Kubie J., Halpern M. (1975) Laboratory observations of trailing behavior in garter snakes. *Journal of Comparative & Physiological Psychology*. 89:667-74.
- Kuczenski R., Segal D. (1989) Concomitant characterization of

- behavioral and striatal neurotransmitter response to amphetamine using in vivo microdialysis. *The Journal of Neuroscience*. 9:2051-2065.
- Kumar A., Dudley C.A., Moss R.L. (1999) Functional dichotomy within the vomeronasal system: distinct zones of neuronal activity in the accessory olfactory bulb correlate with sex-specific behaviors. *The Journal of Neuroscience*. 19:RC32.
- Kuzmin A.V., Gerrits M.A., van Ree J.M., Zvartau E.E. (1997) Naloxone inhibits the reinforcing and motivational aspects of cocaine addiction in mice. *Life Sciences*. 60:L64
- Ladewig J., Price E.O., Hart B.L. (1980) Flehmen in male goats: role in sexual behavior. *Behavioral & Neural Biology*. 30:312-22.
- Landauer M.R., Balster R.L. (1982)a. A new test for social investigation in mice: effects of d-amphetamine. *Psychopharmacology (Berl)*, 78:322-5.
- Landauer M.R., Balster R.L. (1982)b. Opiate effects on social investigatory behavior of male mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 17:1181-6.
- Langer S.Z. (1980) Presynaptic regulation of the release of catecholamines. *Pharmacological Reviews*. 32:337-62.
- Landwehrmeyer B., Mengod G., Palacios J.M. (1993) Differential visualization of dopamine D2 and D3 receptor sites in rat brain. A comparative study using in situ hybridization histochemistry and ligand binding autoradiography. *European Journal of Neuroscience*. 5:145-53.
- Lanuza E., Halpern M. (1997) Afferent and efferent connections of the nucleus sphericus in the snake *Thamnophis sirtalis*: convergence of olfactory and vomeronasal information in the lateral cortex and the amygdala. *Journal of Comparative Neurology*. 385:627-40.
- Lanuza E., Novejarque A., Martínez-Ricós A., Martínez-Hernández J., Agustín-Pavón C., Martínez-García F. Sexual pheromones and the evolution of the reward system of the brain: The chemosensory function of the amygdala. *Brain Research Bulletin*. 75:460-6.

- Lasater E.M. (1987) Retinal horizontal cell gap junctional conductance is modulated by dopamine through a cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 84:7319-7323.
- LeDoux J.E. (2000) Emotion circuits in the brain. *Annual Reviews of Neuroscience.* 23:155-84.
- LeDoux J.E., Iwata J., Cicchetti P., Reis D.J. (1988) Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *The Journal of Neuroscience.* 8:2517-29.
- Le Foll B., Goldberg S.R., Sokoloff P. (2005) The dopamine D3 receptor and drug dependence: effects on reward or beyond? *Neuropharmacology.* 49:525-41.
- Leinders-Zufall T., Brennan P., Widmayer P., S P.C., Maul-Pavicic A., Jager M., Li X.H., Breer H., Zufall F., Boehm T. (2004) MHC class I peptides as chemosensory signals in the vomeronasal organ. *Science.* 306:1033-7.
- Lerich L., Diaz J., Sokoloff P. (2004) Dopamine and glutamate dysfunctions in schizophrenia: role of the dopamine D3 receptor. *Neurotoxicity Research.* 6:63-71.
- Leypold B.G., Yu C.R., Leinders-Zufall T., Kim M.M., Zufall F., Axel R. (2002) Altered sexual and social behaviors in TRP2 mutant mice. *Proceeding of the National Academy of Sciences U.S.A.* 99:6376-81.
- Li X., Morrow D., Witkin J.M. (2006) Decreases in nestlet shredding of mice by serotonin uptake inhibitors: comparison with marble burying. *Life Sciences.* 78:1933-9.
- Li S.M., Yin L.L., Shi J., Lin Z.B., Zheng J.W. (2002) The effect of 7-nitroindazole on the acquisition and expression of D-methamphetamine-induced place preference in rats. *European Journal of Pharmacology.* 435:217-23.
- Liman E.R., Corey D.P., Dulac C. (1999) TRP2: a candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences U.S.A.* 96:5791-6.
- Londei T., Valentini A.M., Leone V.G. (1998) Investigative burying by laboratory mice may involve non-functional, compulsive, behaviour. *Behavioral Brain Research*. 94:249-54.
- Loughlin S.E., Leslie F.M. y Fallon J.H (1995) Endogenous opioid systems. *The Rat Nervous System, 2ª Ed. George Paxinos, Academic Press.* 975-1001.
- Lucas G., Spampinato U. (2000) Role of striatal serotonin_{2A} and serotonin_{2C} receptor subtypes in the control of in vivo dopamine outflow in the rat striatum. *Journal of Neurochemistry*. 74:693-701.
- Luo A.H., Cannon E.H., Wekesa K.S., Lyman R.F., Vandenberg J.G., Anholt R.R. (2002) Impaired olfactory behavior in mice deficient in the alpha subunit of G(o). *Brain Research*. 941:62-71.
- Malaspina D., Coleman E. (2003) Olfaction and social drive in schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*. 60:578-84.
- Maldonado R., Saiardi A., Valverde O., Samad T.A., Roques B.P., Borrelli E. (1997) Absence of opiate rewarding effects in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature*. 388:586-9.
- Mani S.K., Allen J.M., Rettori V., McCann S.M., O'Malley B.W., Clark J.H. (1994) Nitric oxide mediates sexual behavior in female rats. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences U.S.A.* 91:6468-72.
- Manzanedo C., Aguilar M.A., Rodriguez-Arias M., Navarro M., Minarro J. (2004) 7-Nitroindazole blocks conditioned place preference but not hyperactivity induced by morphine. *Behavioral Brain Research*. 150:73-82.
- Martínez-García F., Martínez-Marcos A., Lanuza E. (2002) The pallial amygdala of amniote vertebrates: evolution of the concept, evolution of the structure. *Brain Research Bulletin*. 57:463-9.
- Martínez-García F., Novejarque A., Lanuza E. (2007) Evolution of the amygdala in vertebrates. *Evolution of Nervous Systems, a comprehensive reference. Academic Press*, 255-334
- Martínez-García F., Novejarque A., Lanuza E. (2008) Two

- interconnected functional systems in the amygdala of amniote vertebrates. *Brain Research Bulletin*.75:206-13.
- Martínez-García F., Olucha F.E., Teruel V., Lorente M.J., Schwerdtfeger W.K. (1991) Afferent and efferent connections of the olfactory bulbs in the lizard *Podarcis hispanica*. *Journal of Comparative Neurology*. 305:337-47.
- Martínez-Hernández J., Lanuza E., Martínez-García F. (2006) Selective dopaminergic lesions of the ventral tegmental area impair preference for sucrose but not for male sexual pheromones in female mice. *European Journal of Neuroscience*, 24:885-93.
- Martínez-Marcos A., Halpern M. (1999) Differential centrifugal afferents to the anterior and posterior accessory olfactory bulb. *Neuroreport*. 10:2011-5.
- Martínez-Marcos A., Ubeda-Bañón I., Halpern M. (2001) Neural substrates for tongue-flicking behavior in snakes. *Journal of Comparative Neurology*. 432:75-87.
- Martínez-Marcos A, Ubeda-Bañón I, Lanuza E, Halpern M. (2005a) Chemoarchitecture and afferent connections of the "olfactostriatum": a specialized vomeronasal structure within the basal ganglia of snakes. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 29:49-69.
- Martínez-Marcos A, Ubeda-Bañón I, Lanuza E, Halpern M. (2005b) Efferent connections of the "olfactostriatum": a specialized vomeronasal structure within the basal ganglia of snakes. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 29:217-26.
- Martínez-Ricós J., Agustín M.C., Lanuza E., Martínez-García F. (2004) Male sexual pheromones are reinforcing to female mice: evidence using the conditioned place preference paradigm. *FENS Forum Abstracts*, A159-19:340
- Martínez-Ricós J., Agustín-Pavón C., Lanuza E., Martínez-García F. (2007). Intraspecific communication through chemical signals in female mice: reinforcing properties of involatile male sexual pheromones. *Chemical Senses*. 32:139-48.
- Martínez-Ricós J., Agustín-Pavón C., Lanuza E., Martínez-García F.

- Role of the vomeronasal system in intersexual attraction in female mice. *Neuroscience. In press*
- Matsunami H., Buck L.B. (1997) A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals. *Cell*. 90:775-84.
- McClintock M.K. (2002) Pheromones, odors and vasanas: the neuroendocrinology of social chemosignals in humans and animals. *Hormones, Brain and Behavior*. Pfaff, Arnold, Etgen, Fabrbach, Rubin, editors. *Academic Press*. 139-214.
- McDonald A.J. (2003) Is there an amygdala and how far does it extend? An anatomical perspective. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 985:1-21.
- McGregor A., Herbert J. (1992) The effects of beta-endorphin infusions into the amygdala on visual and olfactory sensory processing during sexual behaviour in the male rat. *Neuroscience*. 46:173-179.
- McIntosh T.K., Vallano M.L., Barfield R.J. (1980) Effects of morphine, beta-endorphin and naloxone on catecholamine levels and sexual behavior in the male rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 13:435-41.
- McKittrick D.J., Krukoff T.L., Calaresu F.R. (1992) Expression of c-fos protein in rat brain after electrical stimulation of the aortic depressor nerve. *Brain Research*. 599:215-22.
- Meisel R.L., Joppa M.A. Rowe R.K. (1996) Dopamine receptor antagonists attenuate conditioned place preference following sexual behavior in female Syrian hamsters. *European Journal of Pharmacology*. 309:21-24.
- Menalled L.B., Dziewczapolski G., Garcia M.C., Rubinstein M., Gershanik O.S. (1999) D3 receptor knockdown through antisense oligonucleotide administration supports its inhibitory role in locomotion. *Neuroreport*. 10:3131-6.
- Meredith M. (1986) Vomeronasal organ removal before sexual experience impairs male hamster mating behavior. *Physiology & Behavior*. 36:737-43.
- Meredith M., O'Connell R.J. (1979) Efferent control of stimulus access to the hamster

- vomeronasal organ. *Journal of Physiology*. 286:301-316.
- Meyer G., Gonzalez-Hernandez T., Carrillo-Padilla F., Ferres-Torres R. (1989) Aggregations of granule cells in the basal forebrain (islands of Calleja): Golgi and cytoarchitectonic study in different mammals, including man. *Journal of Comparative Neurology*. 284:405-28.
- Meyer G., Gonzalez-Hernandez T., Galindo-Mireles D., Carrillo-Padilla F., Ferres-Torres R. (1994) NADPH-d activity in the islands of Calleja: a regulatory system of blood flow to the ventral striatum/pallidum? *Neuroreport*. 5:1281-4.
- Miczek K.A., Mos J., Olivier B. (1989) Brain 5-HT and inhibition of aggressive behavior in animals: 5-HIAA and receptor subtypes. *Psychopharmacological Bulletin*. 25:399-403.
- Mijnster M.J., Raimundo A.G., Koskuba K., Klop H., Docter G.J., Groenewegen H.J., Voorn P. (1997) Regional and cellular distribution of serotonin 5-hydroxytryptamine_{2a} receptor mRNA in the nucleus accumbens, olfactory tubercle, and caudate putamen of the rat. *Journal of Comparative Neurology*. 389:1-11.
- Mitchell J.B., Gratton A. (1991) Opioid modulation and sensitization of dopamine release elicited by sexually relevant stimuli: a high speed chronoamperometric study in freely behaving rats. *Brain Research*. 551:20-7.
- Mitchell J.B., Gratton A. (1992) Mesolimbic dopamine release elicited by activation of the accessory olfactory system: a high speed chronoamperometric study. *Neuroscience Letters*. 140:81-4.
- Mitra S.W., Hoskin E., Yudkovitz J., Pear L., Wilkinson H.A., Hayashi S., Pfaff D.W., Ogawa S., Rohrer S.P., Schaeffer J.M., McEwen B.S., Alves S.E. (2003) Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology*. 144:2055-67.
- Moberg P.J., Arnold S.E., Doty R.L., Kohler C., Kanen S., Seigel S., Gur R.E., Turetsky B.I. (2003)

- Impairment of odor hedonics in men with schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*. 160:1784-9.
- Mohedano-Moriano A., Pro-Sistiaga P., Ubeda-Bañón I., Crespo C., Insausti R., Martínez-Marcos A. (2007) Segregated pathways to the vomeronasal amygdala: differential projections from the anterior and posterior divisions of the accessory olfactory bulb. *European Journal of Neuroscience*. 25:2065-80.
- Moles A., Cooper S.J. (1995) Opioid modulation of sucrose intake in CD-1 mice: effects of gender and housing conditions. *Physiology & Behavior*. 58:791-6.
- Moncho-Bogani J., Lanuza E., Hernandez A., Novejarque A., Martínez-García F. (2002) Attractive properties of sexual pheromones in mice. Innate or learned? *Physiology & Behavior*. 77:167-176.
- Moncho-Bogani J., Lanuza E., Lorente M.J., Martínez-García F. (2004) Attraction to male pheromones and sexual behaviour show different regulatory mechanisms in female mice. *Physiology & Behavior*. 81:427-34.
- Moncho-Bogani, J., Martínez-García, F., Novejarque, A., Lanuza E. (2005) Attraction to sexual pheromones and associated odorants in female mice involves activation of the reward system and basolateral amygdala. *European Journal of Neuroscience*. 21:2186-2198.
- Moore R.Y., Card J.P. (1984) Noradrenaline-containing systems in the CNS. En *Handbook of Chemical Neuroanatomy, Vol. 2. Classical Transmitters in the CNS, Part 1. Elsevier Science Publishers*. 123-156.
- Morley J.E., Farr S.A., Suarez M.D., Flood J.F. (1995) Nitric oxide synthase inhibition and food intake: effects on motivation to eat and in female mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 50:369-73.
- Moskowitz A.S., Goodman R.R. (1984) Light microscopic autoradiographic localization of mu and delta opioid binding sites in the mouse central nervous system. *The Journal of Neuroscience*. 4:1331-42.
- Mossman C.A., Drickamer L.C. (1996) Odor preferences of female

- house mice (*Mus domesticus*) in seminatural enclosures. *Journal of Comparative Psychology*. 110:131-8.
- Mucha R.F., Iversen S.D. (1986) Increased food intake after opioid microinjections into nucleus accumbens and ventral tegmental area of rat. *Brain Research*. 397:214-24.
- Mucignat-Caretta C., Caretta A., Baldini E. (1998) Protein-bound male urinary pheromones: differential responses according to age and gender. *Chemical Senses*. 23:67-70.
- Muehlenkamp F, Lucion A, Vogel WH. (1995) Effects of selective serotonergic agonists on aggressive behavior in rats. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*. 50:671-4.
- Mulder A.B., Hodenpijl M.G., Lopes da Silva F.H. (1998) Electrophysiology of the hippocampal and amygdaloid projections to the nucleus accumbens of the rat: convergence, segregation, and interaction of inputs. *The Journal of Neuroscience*. 18:5095-102.
- Nedergaard P., Sanchez C., Møllerup E. (2004) Different roles of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors in regulation of female rat paced mating behaviour. *Behavior & Brain Research*. 149:151-7.
- Nelson R.J., Demas G.E., Huang P.L., Fishman M.C., Dawson V.L., Dawson T.M., Snyder S.H. (1995) Behavioural abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Nature*. 378:383-6.
- Newman S.W. (1999) The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 877:242-57.
- Nishi A., Snyder G.L., Greengard P. (1997) Bidirectional regulation of DARPP-32 phosphorylation by dopamine. *The Journal of Neuroscience*. 17:8147-55.
- Njung'e K., Handley S.L. (1991)a Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*. 38:63-7.
- Njung'e K., Handley S.L. (1991) Effects of 5-HT uptake inhibitors, agonists and antagonists on the burying of harmless objects by mice; a

- putative test for anxiolytic agents. *British Journal of Pharmacology*. 104:105-12.
- Novejarque A. (2007) Evolución del cerebro emocional: Análisis comparado de las vías amígdalo-estriatales. *Tesis doctoral. Universitat de València*.
- Novejarque A., Lanuza E., Martínez-García F. (2004) Amygdalo-striatal projections in reptiles: a tract-tracing study in the lizard *Podarcis hispanica*. *Journal of Comparative Neurology*. 479:287-308.
- Novotny M., Harvey S., Jemiolo B., Alberts J. (1985) Synthetic pheromones that promote inter-male aggression in mice. *Proceedings of the Natural Academy of Science U.S.A.* 82:2059-61.
- O'Donnell P., Grace A.A. (1993) Dopaminergic modulation of dye coupling between neurons in the core and shell regions of the nucleus accumbens. *Journal of Neuroscience*. 13:3456-71
- O'Donnell P., Grace A.A. (1997) Cortical afferents modulate striatal gap junction permeability via nitric oxide. *Neuroscience*. 76:1-5.
- Okere C.O., Kaba H., Higuchi T. (1995) Failure of intrabulbar and peripheral administration of N-omega-nitro-L-arginine to prevent the formation of an olfactory memory in mice. *Physiology & Behavior*. 58:387-91.
- Okere C.O., Kaba H., Higuchi T. (1996) Formation of an olfactory recognition in mice: reassessment of the role of nitric oxide. *Neuroscience*. 71:349-54.
- Okere C.O., Kaba H. (2000) Increased expression of neuronal nitric oxide mRNA in the accessory olfactory bulb during the formation of olfactory recognition memory in mice. *European Journal of Neuroscience*. 12:4552-6.
- Olds J., Milner P. (1954) Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of the rat brain. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 47:419-427.
- Olds J., Travis R.P., Schwing R.G. (1960) Topographic organization of hypothalamic self-stimulation functions. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 53:23-32

- Ostrowski N.L., Stapleton J.M., Noble R.G., Reid L.D. (1979) Morphine and naloxone's effects on sexual behavior of the female golden hamster. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 11:673-81.
- Owens M.J., Morgan W.N., Plott S.J., Nemeroff C.B. (1997) Neurotransmitter receptor and transporter binding profile of antidepressants and their metabolites. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 283:1305-1322.
- Paredes R.G., Agmo A. (2004) Has dopamine a physiological role in the control of sexual behavior? A critical review of the evidence. *Progress in Neurobiology*. 73:179-226.
- Paredes R.G., Baum M.J. (1997) Role of the medial preoptic area/anterior hypothalamus in the control of masculine sexual behavior. *Annual Reviews of Sex Research*. 8:68-101.
- Paredes R.G., Martinez I. (2001) Naloxone blocks place preference conditioning after paced mating in female rats. *Behavioral Neuroscience*. 115:1363-7.
- Peciña S., Berridge K.C. (2005) Hedonic hot spot in nucleus accumbens shell: where do mu-opioids cause increased hedonic impact of sweetness? *Journal of Neuroscience*. 25:11777-86.
- Peciña, S., Berridge, K.C., Parker, L.A. (1997) Pimozide does not shift palatability: separation of anhedonia from sensorimotor suppression by taste reactivity. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 58:801-811.
- Pfaff D.W., Sakuma Y. (1979)a Facilitation of the lordosis reflex of female rats from the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *The Journal of Physiology*. 288, 189-202.
- Pfaff D.W., Sakuma Y. (1979)b Deficit in the lordosis reflex of female rats caused by lesions in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *The Journal of Physiology*. 288:203-10.
- Pfaus J. G., Gorzalka B. B. (1987) Opioids and sexual behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 11:1-34.
- Pinel J.P.J., Treit D. (1978) Burying as a defensive response in rats.

- Journal of Comparative. Physiology & Psychology.* 92:708–712.
- Pitkanen A. (2000) Connectivity of the rat amygdaloid complex. *The Amygdala. A functional analysis.* John p. Aggleton Ed. Oxford University Press. 31-115
- Pitkanen A., Savander V., LeDoux J.E. (1997) Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends in Neuroscience.* 20:517-23.
- Poran N.S., Vandoros A., Halpern M. (1993) Nuzzling in the gray short-tailed opossum. I: Delivery of odors to vomeronasal organ. *Physiology & Behavior.* 53:959-67.
- Poschel B.P, Ninteman F.W. (1963) Norepinephrine: a possible excitatory neurohormone of the reward system. *Life sciences.* 10:782-8.
- Prado-Alcala R., Wise R.A. (1984) Brain stimulation reward and dopamine terminal fields. I. Caudate-putamen, nucleus accumbens and amygdala. *Brain Research.* 16:265-73.
- Purves D., Augustine G.J., Fitzpatrick D., Katz L.C., Lamantia A., McNamara J.O., Williams M. (2001) *Neuroscience* 2^a Ed. Sinauer Associates Inc.
- Rainbow T.C., Parsons B., Wolfe B.B. (1984) Quantitative autoradiography of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in rat brain. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences U.S.A.* 81:1585-9.
- Rainnie D.G. (1999) Serotonergic modulation of neurotransmission in the rat basolateral amygdala. *Journal of Neurophysiology.* 82:69-85.
- Ramage A.G. (2001) Central cardiovascular regulation and 5-hydroxytryptamine receptors. *Brain Research Bulletin.* 56:425-39.
- Ramos B.P., Arnsten A.F. (2007) Adrenergic pharmacology and cognition: focus on the prefrontal cortex. *Pharmacology & Therapeutics.* 113:523-36.
- Reader T.A., Ase A.R., Hébert C., Amdiss F. (1999) Distribution of dopamine, its metabolites, and D1 and D2 receptors in heterozygous and homozygous weaver mutant mice. *Neurochemical Research.* 24:1455-70.
- Reimann I.W., Ziegler G., Ludwig L., Frölich J.C. (1986) Central and

- autonomic nervous system side effects of ketanserin. *Arzneimittelforschung*. 36:1681-4.
- Restrepo D., Arellano J., Oliva A.M., Schaefer M.L., Lin W. (2004) Emerging views on the distinct but related roles of the main and accessory olfactory systems in responsiveness to chemosensory signals in mice. *Hormones & Behavior*. 46:247-56.
- Ribak C.E., Fallon J.H. (1982) The island of Calleja complex of rat basal forebrain. I. Light and electron microscopic observations. *Journal of Comparative Neurology*. 205:207-18.
- Ridray S., Griffon N., Mignon V., Souil E., Carboni S., Diaz J., Schwartz J.C., Sokoloff P. (1998) Coexpression of dopamine D1 and D3 receptors in islands of Calleja and shell of nucleus accumbens of the rat: opposite and synergistic functional interactions. *European Journal of Neuroscience*. 10:1676-86.
- Riedel A., Härtig W., Seeger G., Gärtner U., Brauer K., Arendt T. (2002) Principles of rat subcortical forebrain organization: a study using histological techniques and multiple fluorescence labeling. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 23:75-104.
- Rodrigo J., Springall D.R., Uttenthal O., Bentura M.L., Abadia-Molina F., Riveros-Moreno V., Martinez-Murillo R., Polak J.M., Moncada S. (1994) Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B Biol Sci*. 345:175-221.
- Romero P. R., Beltramino C. A., Carrer H. F. (1990) Participation of the olfactory system in the control of approach behavior of the female rat to the male. *Physiology & Behavior*. 47:685-690.
- Rompré P.P., Wise R.A. (1989) Opioid-neuroleptic interaction in brainstem self-stimulation. *Brain Research*. 477:144-51.
- Rössler A.S., Bernabé J., Denys P., Alexandre L., Giuliano F. (2006) Effect of the 5-HT receptor agonist DOI on female rat sexual behavior. *The Journal of Sexual Medicine*. 3:432-41
- Rothman R.B., Baumann M.H., Dersch C.M., Romero D.V., Rice K.C., Carroll F.I., Partilla J.S.

- (2001) Amphetamine-type central nervous system stimulants release norepinephrine more potently than they release dopamine and serotonin. *Synapse*. 39:32-41.
- Rupp C.I. (2003) Dysfunctions in olfactory processing in schizophrenia, *Current Opinion in Psychiatry*. 16:181-185.
- Ryba N.J., Tirindelli R. (1997) A new multigene family of putative pheromone receptors. *Neuron*. 19:371-9.
- Salamone J.D., Correa M. (2002) Motivational views of reinforcement: implications for understanding the behavioral functions of nucleus accumbens dopamine. *Behavioral Brain Research*. 137:3-25.
- Sachs B.D. (1997) Erection evoked in male rats by airborne scent from estrous females. *Physiology & Behavior*. 62:921-4.
- Sahraei H., Falahi M., Zarrindast M.R., Sabetkasaei M., Ghoshooni H., Khalili M. (2004) The effects of nitric oxide on the acquisition and expression of nicotine-induced conditioned place preference in mice. *European Journal of Pharmacology*. 503:81-7.
- Samana B., Boehm N. (1999) Inhibition of nitric oxide impairs early olfactory associative learning in newborn rats. *Neurobiology of Learning and Memory*. 71:219-31.
- Saper C. B., Chou T. C. Scammell T. E. (2001) The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. *Trends in Neuroscience*. 24:726-731.
- Scalia F., Winans S.S. (1975) The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *Journal of Comparative Neurology*. 161:31-55.
- Schaal B., Coureaud G., Langlois D., Ginies C., Semon E., Perrier G. (2003) Chemical and behavioural characterization of the rabbit mammary pheromone. *Nature*. 424:68-72.
- Schultz W. (2002) Getting formal with dopamine and reward. *Neuron*. 36:241-63.
- Schultz W. (2007) Behavioral dopamine signals. *Trends in Neurosciences*. 30:203-10.
- Sealfon S.C., Olanow C.W. (2000) Dopamine receptors: from

- structure to behavior. *Trends in Neuroscience*. 23(10 Suppl):S34-40.
- Segieth J., Pearce B., Fowler L., Whitton P.S. (2001) Regulatory role of nitric oxide over hippocampal 5-HT release in vivo. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 363:302-6.
- Sharrow S.D., Vaughn J.L., Zidek L., Novotny M.V., Stone M.J. (2002) Pheromone binding by polymorphic mouse major urinary proteins. *Protein Science*. 11:2247-56.
- Shepherd G.M. (1994) *Neurobiology*. Oxford University Press, 3rd Ed.
- Shipley M.T., McLean J.H., Ennis M. (1995) Olfactory System. *The Rat Nervous System*, Ed. George Paxinos, Academic Press, 2nd Ed. 899-926.
- Singh R., Pervin S., Shryne J., Gorski R., Chaudhuri G. (2000) Castration increases and androgens decrease nitric oxide synthase activity in the brain: physiologic implications. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences U.S.A.* 97:3672-7.
- Skinner B.F. (1953) *Science and Human Behavior*. Macmillan, New York.
- Smith K.S., Berridge K.C. (2007) Opioid limbic circuit for reward: interaction between hedonic hotspots of nucleus accumbens and ventral pallidum. *The Journal of Neuroscience*. 27:1594-605.
- Snijdewint F.G., Van Leeuwen F.W., Boer G.J. (1989) Ontogeny of vasopressin and oxytocin binding sites in the brain of Wistar and Brattleboro rats as demonstrated by lightmicroscopical autoradiography. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 2:3-17.
- Sokoloff P., Diaz J., Le Foll B., Guillin O., Leriche L., Bezard E., Gross C. (2006) The dopamine D3 receptor: a therapeutic target for the treatment of neuropsychiatric disorders. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*. 5:25-43.
- Sora I., Hall F.S., Andrews A.M., Itokawa M., Li X.F., Wei H.B., Wichems C., Lesch K.P., Murphy D.L., Uhl G.R. (2001) Molecular mechanisms of cocaine reward: combined dopamine and serotonin transporter knockouts eliminate cocaine place preference. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences U.S.A.* 98:5300-5.
- Sora I., Wichems C., Takahashi N., Li X.F., Zeng Z., Revay R., Lesch

- K.P., Murphy D.L., Uhl G.R. (1998) Cocaine reward models: conditioned place preference can be established in dopamine- and in serotonin-transporter knockout mice. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences U.S.A.* 95:7699-704.
- Spanagel R., Weiss F. (1999) The dopamine hypothesis of reward: past and current status. *Trends in Neuroscience.* 22:521-7.
- Steiner J.E. (1974) Discussion paper: innate, discriminative human facial expressions to taste and smell stimulation. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 237:229-33.
- Steiner J.E., Glaser D. (1995) Taste-induced facial expressions in apes and humans. *Human Evolution.* 10:97-105.
- Stephenson C.P., Hunt G.E., Topple A.N., McGregor I.S. (1999) The distribution of 3,4-methylenedioxymethamphetamine "Ecstasy"-induced c-fos expression in rat brain. *Neuroscience.* 92:1011-23.
- Stern K., McClintock M.K. (1998) Regulation of ovulation by human pheromones. *Nature.* 392:177-9.
- Stowers L., Holy T.E., Meister M., Dulac C., Koentges G. (2002) Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science.* 295:1493-500.
- Sugai T., Yoshimura H., Kato N., Onoda N. (2006) Component-dependent urine responses in the rat accessory olfactory bulb. *Neuroreport.* 17:1663-7.
- Summer B.E., Fink G. (1995) Estrogen increases the density of 5-hydroxytryptamine(2A) receptors in cerebral cortex and nucleus accumbens in the female rat. *The Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology.* 54:15-20.
- Swanson L.W., Petrovich G.D. (1998) What is the amygdala? *Trends in Neuroscience.* 21:323-31.
- Szabo C. (1996) Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide in the central nervous system. *Brain Research Bulletin.* 41:131-41
- Tahsili-Fahadan P., Yahyavi-Firouzi-Abadi N., Orandi A.H., Esmaili B., Basseda Z., Dehpour A.R. (2006) Rewarding properties of

- sildenafil citrate in mice: role of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Psychopharmacology (Berl)*. 185:201-7.
- Takahashi LK, Hubbard DT, Lee I, Dar Y, Sipes SM. (2007) Predator odor-induced conditioned fear involves the basolateral and medial amygdala. *Behavioral Neuroscience*. 121:100-10.
- Talbot K., Woolf N.J., Butcher L.L. (1988) Feline islands of Calleja complex: II. Cholinergic and cholinesterasic features. *Journal of Comparative Neurology*. 275:580-603.
- Thomas S.A., Palmiter R.D. (1997) Impaired maternal behavior in mice lacking norepinephrine and epinephrine. *Cell*. 91:583-92.
- Thorndike E.L. (1911) *Animal Intelligence*. Macmillan, New York.
- Trabace L., Kendrick K.M. (2000) Nitric oxide can differentially modulate striatal neurotransmitter concentrations via soluble guanylate cyclase and peroxynitrite formation. *Journal of Neurochemistry*. 75:1664-74.
- Trainor B.C., Workman J.L., Jessen R., Nelson R.J. (2007) Impaired nitric oxide synthase signaling dissociates social investigation and aggression. *Behavioral Neuroscience*. 121:362-9.
- Trantham-Davidson H., Neely L.C., Lavin A. y Seamans J.K. (2004) Mechanisms underlying differential D1 versus D2 dopamine receptor regulation of inhibition in prefrontal cortex. *The Journal of Neuroscience*. 24:10652-9.
- Tribollet E., Audigier S., Dubois-Dauphin M., Dreifuss J.J. (1990) Gonadal steroids regulate oxytocin receptors but not vasopressin receptors in the brain of male and female rats. An autoradiographical study. *Brain Research*. 511:129-40.
- Trinh K., Storm D.R. (2003) Vomeronasal organ detects odorants in absence of signaling through main olfactory epithelium. *Nature Neuroscience*. 6:519-25.
- Tzschentke T.M. (1998) Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Progress in Neurobiology*. 56:613-72.

- Ubeda-Bañón I., Novejarque A., Mohedano-Moriano A., Pro-Sistiaga P., de la Rosa-Prieto C., Insausti R., Martínez-García F., Lanuza E., Martínez-Marcos A. (2007) Projections from the posterolateral olfactory amygdala to the ventral striatum: neural basis for reinforcing properties of chemical stimuli. *BMC Neuroscience*. 8:103
- Ubeda-Bañón I., Novejarque A., Mohedano-Moriano A., Pro-Sistiaga P., Insausti R., Martínez-García F., Lanuza E., Martínez-Marcos A. (2008) Vomeronasal inputs to the rodent ventral striatum. *Brain Research Bulletin*. 75(2-4):467-73
- Ungerstedt U. (1971) Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiologica Scandinavica Suppl*. 367:95-122.
- Vallone D, Picetti R, Borrelli E (2000) Structure and function of dopamine receptors. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 24:125-132
- Van den Berg C.L., Van Ree J.M., Spruijt B.M., Kitchen I. (1999) Effects of juvenile isolation and morphine treatment on social interactions and opioid receptors in adult rats: behavioural and autoradiographic studies. *European Journal of Neuroscience*. 11:3023-3032.
- Van Furth W.R., van Ree J.M. (1996) Sexual motivation: involvement of endogenous opioids in the ventral tegmental area. *Brain Research*. 729:20-8.
- Van Ree J.M., Gerrits M.A., Vanderschuren L.J. (1999) Opioids, reward and addiction: An encounter of biology, psychology, and medicine. *Pharmacological Reviews*. 51:341-96.
- Van Ree J.M., Niesink R.J., Van Wolfswinkel L., Ramsey N.F., Kornet M.M., Van Furth W.R., Vanderschuren L.J., Gerrits M.A., Van den Berg C.L. (2000) Endogenous opioids and reward. *European Journal of Pharmacology*. 405:89-101.
- Veening J.G., Coolen L.M., de Jong T.R., Joosten H.W., de Boer S.F., Koolhaas J.M., Olivier B. (2005) Do similar neural systems subserve aggressive and sexual behaviour in male rats? Insights

- from c-Fos and pharmacological studies. *European Journal of Pharmacology*. 526:226-39.
- Velazquez J.L., Han D., Carlen P.L. (1997) Neurotransmitter modulation of gap junctional communication in the rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience*. 9:2522-31.
- Viitamaa T., Haapalinna A., Agmo A. (2006) The adrenergic alpha2 receptor and sexual incentive motivation in male rats. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*. 83:360-9.
- Von Campenhausen H., Mori K. (2000) Convergence for pheromonal pathways from the accessory olfactory bulb to the cortex in the mouse. *European Journal Neuroscience*. 12:33-46
- Waldhoer M., Bartlett S.E., Whistler J.L. (2004) Opioid receptors. *Annual Reviews of Biochemistry*. 73:953-90.
- Wamsley J.K., Gehlert D.R., Filloux F.M., Dawson T.M. (1989) Comparison of the distribution of D-1 and D-2 dopamine receptors in the rat brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 2:119-37.
- Weiner C.P., Lizasoain I., Baylis S.A., Knowles R.G., Charles I.G., Moncada S. (1994) Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 91:5212-6.
- Whitten W.K. (1966) Pheromones and mammalian reproduction. *Advances in Reproductive Physiology, McLaren, A., editor. Academic, London, Vol. 1.* 155-177.
- Wiesner J.B., Moss R.L. (1984) Beta-endorphin suppression of lordosis behavior in female rats; lack of effect of peripherally-administered naloxone. *Life Sciences*. 34:1455-62.
- Winslow J.T., Hastings N., Carter C.S., Harbaugh C.R., Insel T.R. (1993) A role for central vasopressin in pair bonding in monogamous prairie voles. *Nature*. 365:545-8.
- Wirtshafter D., Osborn C.V. (2004) The distribution of m4 muscarinic acetylcholine receptors in the islands of Calleja and striatum of rats and cynomolgus monkeys. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 28:107-16.

- Wise R.A. (1978) Catecholamine theories of reward: a critical review. *Brain Research*. 152:215-47.
- Wise R.A. (2004) Dopamine, learning and motivation. *Nature Reviews in Neuroscience*. 5:483-94.
- Wise R.A., Rompré P.P. (1989) Brain dopamine and reward. *Annual Reviews of Psychology*, 40:191-225.
- Wise R.A., Schwartz H.V. (1981) Pimozide attenuates acquisition of lever-pressing for food in rats. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 15:655-6.
- Wise R.A., Spindler J., deWit H., Gerberg G.J. (1978) Neuroleptic-induced "anhedonia" in rats: pimozide blocks reward quality of food. *Science*. 201:262-4.
- Wyart C., Webster W.W., Chen J.H., Wilson S.R., McClary A., Khan R.M., Sobel N. (2007) Smelling a single component of male sweat alters levels of cortisol in women. *Journal of Neuroscience*. 27:1261-5.
- Wysocki C.J., Wellington J.L., Beauchamp G.K. (1980) Access of urinary nonvolatiles to the mammalian vomeronasal organ. *Science*. 207:781-3.
- Wysocki C.J., Nyby J., Whitney G., Beauchamp G.K., Katz Y. (1982) The vomeronasal organ: primary role in mouse chemosensory gender recognition. *Physiology & Behavior*. 29:315-327.
- Wyvell C.L., Berridge K.C. (2000) Intra-accumbens amphetamine increases the conditioned incentive salience of sucrose reward: enhancement of reward "wanting" without enhanced "liking" or response reinforcement. *The Journal of Neuroscience*. 20:8122-8130.
- Xu M., Koeltzow T.E., Santiago G.T., Moratalla R., Cooper D.C., Hu X.T., White N.M., Graybiel A.M., White F.J., Tonegawa S. (1997) Dopamine D3 receptor mutant mice exhibit increased behavioral sensitivity to concurrent stimulation of D1 and D2 receptors. *Neuron*. 19:837-48.
- Yamazaki, K., Boyse, E. A., Mike', V., Thaler, H. T., Mathieson, B. J., Abbott, J., Boyse, J., Zayas, Z. A., Thomas, L. (1976) Control of mating preferences in mice by genes in the major histocompatibility complex. *The Journal of Experimental Medicine*. 144:1324-1335.

- Young W.S. 3rd, Kuhar M.J. (1980)
Noradrenergic alpha 1 and alpha
2 receptors: light microscopic
autoradiographic localization.
*Proceedings of the Natural Academy of
Sciences U.S.A.* 77:1696-700.
- Young S.T., Porrino L.J., Iadarola M.J.
(1991) Cocaine induces striatal c-
fos-immunoreactive proteins via
dopaminergic D1 receptors.
*Proceedings of the Natural Academy of
Sciences U.S.A* 88:1291-5.
- Zancanaro C., Caretta C.M., Bolner A.,
Sbarbati A., Nordera G.P.,
Osculati F. (1997) Biogenic
amines in the vomeronasal organ.
Chemical Senses. 22:439-45.
- Zhu W., Pan Z.Z. (2005) Mu-opioid-
mediated inhibition of glutamate
synaptic transmission in rat
central amygdala neurons.
Neuroscience. 133:97-103.
- Zufall F., Kelliher K.R., Leinders-
Zufall T. (2002) Pheromone
detection by mammalian
vomeronasal neurons. *Microscopy
Research Techniques.* 58:251-60.