

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA FUNCIONAL I
ANTROPOLOGIA FÍSICA

FEROMONES SEXUALS: UN NOU ESTÍMUL REFORÇANT
EN RATOLINS

JOANA MARTÍNEZ RICÓS

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2009

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 24 d'abril de 2009 davant un tribunal format per:

- Dr. José Francisco Pertusa Grau
- Dr. Jesús Pérez Clausell
- Dr. Alino Martínez Marcos
- Dra. Amparo Novejarque Gadea
- Dr. Vicent Teruel Martí

Va ser dirigida per:

Dr. Fernando Martínez García

Dr. Enrique Lanuza Navarro

©Copyright: Servei de Publicacions
Joana Martínez Ricós

Dipòsit legal: V-831-2010

I.S.B.N.: 978-84-370-7581-5

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115



**FEROMONES SEXUALS:
UN NOU ESTÍMUL
REFORÇANT EN
RATOLINS**

TESI DOCTORAL

JOANA MARTÍNEZ RICÓS



Facultat de Ciències Biològiques

Departament de Biologia Funcional
i Antropologia Física

Departament de Biologia Cel·lular i Parasitologia

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

En Fernando Martínez García i N'Enrique Lanuza Navarro,
doctors en Biologia i Professors Titulars dels Departaments de
Biologia Funcional i Antropologia Física i Biologia Cel·lular i
Parasitologia de la Universitat de València

CERTIFIQUEN

Que Na Joana Martínez Ricós, llicenciada en Biologia per la
Universitat de València, ha realitzat sota la seua direcció el treball
titulat: ***Feromones Sexuals: un nou estímul reforçant en
ratolins.***

Per tal que conste, en compliment de la legislació, signem el
present certificat a:

València a

Dr. Fernando Martínez García

Dr. Enrique Lanuza Navarro

Per a la realització d'aquesta tesi, l'autora ha estat beneficiària d'una beca del Programa de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación y Ciencia (convocatòria de l'11 de Juliol del 2003) segons la resolució del 30 de desembre del 2003 de la Secretaría de Estado de Educación y Universidades.

Aquest treball s'ha emmarcat dins dels projectes "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, i "Neurobiología de la atracción sexual. Bases neurales del refuerzo inducido por feromonas sexuales." BFU2004-04272, 2005-2007. Finançats pel Ministeri de Ciència i Tecnologia.

Als meus pares

Tot allò que pots fer, o has somniat que podries fer, has de començar-ho. L'atreviment comporta: geni, poder i màgia.

Johann Wolfgang Von Goethe

A Fernando i a Quique per ser professors, mentors, companys, amics i fins i tot pares! Hi ha persones a la vida que deixen una empremta especial, com vosaltres en mi. Al vostre costat he après molt més que ciència, i us he sentit recolzant-me a cada pas que he donat.

Gràcies de tot cor.

A Carmen, Pepo i M^a José. Com us he trobat a faltar els últims temps! De vosaltres també he après molt, i ha sigut una sort compartir junts aquesta aventura. Us estime molt. En especial a Amparo, a la meua “minina”, perquè ens portem en els nostres corets tant si estem lluny o prop.

A Asun, Pepe i M^a José per tant de suport, tan de consell, tantes converses, tantes coses....m’heu fet sentir en família.

A Ana, Nico, Marcos, Lluís, i Varinia. Em fa molta il·lusió començar amb vosaltres aquesta nova etapa. Em sembla increïble quant de “carinyo” us he agafat ja!

Als meus amics de tota la vida, Javi, Kari, Aida i Ana. Sou la meua família, part de mi i del què sóc. Perquè sempre esteu orgullosos de mi, com jo de vosaltres, i compartir la vida junts és un tresor.

A David per haver-me estimat tant i haver-me donat tant de suport sempre i de manera incondicional.

A les meues germanes, perquè us estime més del que mai us podré transmetre, i m’encanta assemblar-me tant a vosaltres. Als meus “germans”; més enllà que les feu felices a elles, us estime per qui sou.

A Joana, per donar tanta llum a les nostres vides, i omplir-la d'il·lusió! Des que tu existeixes cada dia és un esdeveniment! Quina màgia pot arribar a tenir un simple somriure.

Als meus pares. Espere saber estimar els meus fills tan bé com ho feu vosaltres i que m'admiren la meitat del què jo us admire. Sou un exemple per a mi.

A la resta de la família i amics, en especial a Ester, perquè cadascun de vosaltres a la vostra manera feu la meua vida millor.

A mi mateixa, per fer d'aquests anys una època de creixement personal i intentar traure sempre el millor de cada entrebanc. Podia haver-ho fet millor i segur que més de pressa, però si alguna cosa he après durant aquests anys és que l'objectiu més important per a mi no és el d'arribar la primera a la meta, sinó traure'n el màxim de profit del camí.

ÍNDEX

ÍNDEX DE FIGURES.....

ÍNDEX DE TAULES

I.INTRODUCCIÓ GENERAL	1
I.I QUÈ ÉS EL REFORÇ?	2
I.II ANATOMIA DEL REFORÇ	7
I.II.I La hipòtesi clàssica del reforç: Els experiments d'autoestimulació cerebral.....	7
I.II.II La crisi de la hipòtesi de l'hedònia	12
I.III SEXE I REFORÇ: ESTÍMULS PER L'ATRACCIÓ INTERSEXUAL	13
I.IV FEROMONES SEXUALS EN MAMÍFERS: REALITAT O FANTASIA?	16
I.IV.I És aplicable el concepte de feromona per al cas dels mamífers?	16
I.IV.II El cas de les feromones sexuals de mascle	20

I.V . PAPER DELS SISTEMES OLFACTIU I VOMERONASAL EN LA DETECCIÓ DE FEROMONES	22
OBJECTIUS	27
1. CAPÍTOL 1: PAPER DEL SISTEMA VOMERONASAL EN L'ATRACCIÓ INTERSEXUAL EN FEMELLES DE RATOLÍ.	29
1.1 INTRODUCCIÓ.....	32
1.2 MATERIAL I MÈTODES I RESULTATS	39
1.2.1 Generalitats dels Experiments 1 i 2.....	39
1.2.1.1 Disseny experimental	39
Els tests de preferència o d'elecció simple.....	39
1.2.1.2 Animals	42
1.2.1.3 Cirurgia i tractament post-quirúrgic	43
1.2.1.4 Histologia.....	44
1.2.1.5 Estímul.....	47
1.2.1.6 Anàlisi de dades.....	48
1.2.2 Protocol i Resultats Experiments 1 i 2.....	49
1.2.1.2 Experiment 1: Efectes de la lesió del bulb olfactiu accessori (BOA) en femelles de ratolí sobre l'atracció innata cap a senyals de mascle.	49
1.2.1.2.1 Protocol Experiment 1	49
1.2.1.2.2 Resultats Experiment 1	50

1.2.1.3 Experiment 2: Efecte de la lesió del bulb olfactiu accessori (BOA) en femelles de ratolí sobre la quimioinvestigació de senyals volàtils derivades de mascle.	53
1.2.1.3.1 Protocol Experiment 2	54
1.2.1.3.2 Resultats Experiment 2	56
1.2.3 Experiment 3: Efectes de la lesió del bulb olfactiu accessori (BOA) sobre la funció olfactiva	60
1.2.3.1 Generalitats	60
1.2.3.1.1 Animals.....	60
1.2.3.1.2 Orina.....	61
1.2.3.2 Disseny Experimental i Protocol	61
1.2.3.3 Anàlisi de dades i Resultats.....	62
1.3 DISCUSSIÓ.....	66
1.3.1 L'OVN detecta les feromones sexuals de mascle responsables de l'atracció intersexual	66
1.3.2 El sistema vomeronasal i la identificació de gènere	69
1.3.3 El sistema olfactiu i l'atracció intersexual: possible paper de l'experiència.....	75
1.3.4 Estímuls olfactivs i investigació vomeronasal	80
2. CAPÍTOL 2: LES FEROMONES SEXUALS DE MASCLES SÓN REFORÇANTS PER A LES FEMELLES DE RATOLÍ....	83
2.1 INTRODUCCIÓ	84
2.2 MATERIAL, MÈTODES I RESULTATS.....	128

2.2.1 Generalitats	92
2.2.1.1 Tests de preferència	92
2.2.1.2 Animals	93
2.2.1.3 Estímuls	94
2.2.1.4 Anàlisi de dades.....	95
2.2.2 Experiment 1: Anàlisi de l'atracció cap a senyals de diferents conespecífics en femelles de ratolí	96
2.2.2.1 Protocol	96
2.2.2.2 Resultats	97
2.2.3 Experiment 2: Dinàmica de la quimioinvestigació d'olors neutres i d'olors provinents de conespecífics.	99
2.2.3.1 Protocol	99
2.2.3.2 Resultats	100
2.2.4 Experiment 3: Anàlisi de les propietats reforçants de les feromones atractives	103
2.2.4.2 Disseny experimental	106
2.2.4.2 Resultats	107
2.2.5 Experiment 4: Dinàmica de la preferència de lloc induïda per feromones.....	110
2.2.5.1 Protocol.....	151
2.2.5.2 Resultats.....	151
2.2.6 Experiment 5: Anàlisi de la volatilitat de les senyals químiques reforçants de mascle.	112
2.2.6.1 Protocol	112
2.2.6.2 Resultats	113
2.3 DISCUSSIÓ.....	118

2.3.1 consideracions metodològiques	118
2.3.1.1 Efecte novetat.....	118
2.3.1.2 Efecte sostre	122
2.3.2 Les femelles de ratolí exploren de manera característica les borumballes de diferents conespecífics	125
2.3.3 les feromones sexuals masculines, un nou estímul reforçant per a les femelles de ratolí	128
2.3.3.1 Les feromones masculines indueixen preferència condicionada de lloc a les femelles.	128
2.3.3.2 La significació biològica del valor reforçant de les feromones sexuals	133
2.3.4. El significat biològic de la intensa exploració de la borumballa de femella	137
2.3.5. La borumballa de mascle castrat conté senyals d'identitat.....	141

3. CAPÍTOL 3: CIRCUIT NEURAL DEL REFORÇ DE FEROMONES: INDUCCIÓ DE L'EXPRESSIÓ DEL PROTO-ONCOGEN C-FOS. 147

3.1 INTRODUCCIÓ.....	152
3.2 MATERIAL I MÈTODES.....	160
3.2.1 Disseny experimental	155
3.2.2 Animals.....	156
3.2.3 Proves comportamentals.....	157

3.2.4 Histologia i detecció immunocitoquímica de c-fos	158
3.2.5 Adquisició d'imatges i anàlisi de l'expressió de c-fos en les àrees d'interès.	160
3.2.5.1 Illots de Calleja (ICj).....	162
3.2.5.2 Nucli posteromedial cortical de l'Amígdala (CoApm).....	164
3.2.5.3 Àrea Amígdalo-Hipocàmpica (AHA)	166
3.2.5.4 Nucli Geniculat Lateral Ventral (GLV).....	167
3.2.6 Anàlisi de les dades.....	168
3.3.1 Proves de Comportament	171
3.3.2 Anàlisi de l'expressió de c-fos	171
3.3.2.1 Anàlisi de l'expressió de c-fos al GLV	174
3.3.2.2. Anàlisi de l'expressió de c-fos al CoApm.....	176
3.3.2.3 Anàlisi de l'expressió de c-fos a l'AHA	177
3.3.2.4 Anàlisi de l'expressió de c-fos als Illots de Calleja.....	178
3.3.3. Estudis de correlació	181
3.3.3.1 Correlació entre expressió de c-fos i temps d'exploració de feromones masculines	181
3.3.3.2. Correlació de l'expressió de c-fos entre diverses estructures	183
3.4 DISCUSSIÓ.....	192
3.4.1. Consideracions metodològiques	187
3.4.2. El còrtex vomeronasal es activat per les feromones masculines	188
3.4.3 Els illots de Calleja medials són part de l'estriat vomeronasal	190

3.4.5 Els illots de Calleja laterals: possible substrat de les respostes afectives a olors.....	194
3.4.6 Sobre l'organització funcional de l'estriat ventral	197
3.4.7 Interpretació funcional: el circuit del reforç de feromones.....	200
4.CAPÍTOL 4: DISCUSSIÓ GENERAL	203
4.1 BIOLOGIA DE L'ATRACCIÓ SEXUAL	204
4.2 TENEN FEROMONES SEXUALS ELS MAMÍFERS? LA IMPORTÀNCIA DE CONSIDERAR L'EXPERIÈNCIA.....	216
4.2.1 La identitat química de les feromones sexuals masculines del ratolí.	212
4.3 FEROMONES, ATRACCIÓ I REFORÇ.....	227
4.4 LES FEROMONES I EL REFORÇ DEL SEXE.....	305
4.4.1 Comportament sexual sense funció vomeronasal	225
4.5 NEUROBIOLOGIA DEL REFORÇ DE FEROMONES.....	229
4.5.1 Bases neurals del reforç per feromones sexuals	227
4.5.2 Neuroquímica del reforç per feromones sexuals	230

4.5.3 Diferents circuits per diferents plaers?	233
4.6 LA HIPÒTESI DUAL OLFACTIVA: IDENTIFICAR FRONT A RECONÈIXER.....	244
4.7 LES FEROMONES SEXUALS: UN NOU ESTÍMUL REFORÇANT NATURAL	247
4.8 FEROMONES EN HUMANS.....	256
CAPÍTOL 5: CONCLUSIONS DE LA TESI	256
BIBLIOGRAFIA	260

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1. Procés d'aprenentatge associatiu que hauria tingut lloc a l'experiment de Pavlov.	4
Figura 2. Caixa d'Skinner.....	6
Figura 3. Esquema dels sistemes dopaminèrgics.Els sistemes dopaminèrgics.....	9
Figura 4. Esquema de la via tegmento-estriatal clàssica (Wise i Rompre, 1989).	11
Figura 5. Mecanismes d'acció de les drogues sobre les neurones dopaminèrgiques del sistema mesolímbic.....	12
Figura 6. Talls histològics de l'epiteli olfactiu i de l'òrgan vomeronasal o de Jacobson de la sargantana <i>Podarcis hispanica</i> (B)..	23
Figura 7. Esquema de les vies anatòmiques olfactiva i vomeronasal..	32
Figura 8. A: Esquema de l'òrgan vomeronasal i el bulb olfactiu accessori.....	33
Figura 9. A. Caixa de test a la què realitzàrem els tests d'elecció simple als Experiments 1 i 2.....	40
Figura 10. Seccions sagitals de l'AOB d'un animal Simulat (A-A'), i de dues femelles que tenien una lesió menuda (B-B') i gran (C-C'), respectivament.....	46

Figura 11. Histograma de barres que representa el temps de quimioinvestigació (mitjana \pm SEM) de les femelles dels grup Simulat (A) i Lesió (B) a l'Experiment 1..	52
Figura 12. Histograma de barres del temps de quimioinvestigació observat a les femelles del grup Simulat i a les femelles amb l'AOB lesionat (B,D) durant l'Experiment 2..	58
Figura 13. Caixa utilitzada per als experiments d'habituaçió-deshabituació.....	61
Figura 14. A. Temps d'investigació (mitjana \pm SEM) de les femelles dels grups Simulat i Lesió durant al test d'habituaçió.-deshabituació a l'Experiment 3.....	64
Figura 15. Esquema representatiu de l'associació pavloviana que té lloc entre les feromones no volàtils contigudes a la borumballa embrutada per mascles i els volàtils que emanen de la mateixa.	79
Figura 16. Histograma de barres del temps de quimioinvestigació (mitjana \pm SEM) que mostren les femelles de l'Experiment 1.....	98
Figura 17. Histograma de barres del temps de quimioinvestigació (mitjana \pm SEM) que mostren les femelles de l'experiment 2.....	102
Figura 18. Caixa de <i>place preference</i> estàndard, i caixa de <i>place preference</i> que fem servir als nostres experiments.....	104
Figura 19. Histogrames de barres del temps (mitjana \pm SEM) que les femelles estan sobre cada pot durant l'Experiment 3.....	109

Figura 20. Histograma de barres que representa el temps (mitjana \pm SEM) que les femelles estan sobre cada pot a l'experiment 4.	111
Figura 21. Histograma de barres del temps (mitjana \pm SEM) que les femelles de cada grup estan sobre cada pot durant l'Experiment 5.	116
Figura 22. Esquema de la caixa de test utilitzada als tests d'elecció simple.....	124
Figura 23. Estructura molecular del complex major d'histocompatibilitat.....	142
Figura 24. Esquema de la hipotètica ruta de les molècules de MHC des de la membrana de les cèl·lules fins l'orina.	144
Figura 25. Illots de Calleja ventromedial, Magne i Lateral d'un animal exposat a borumballa embrutada per mascles intactes.. ...	163
Figura 26. Illot de Calleja Magne sobre el què s'ha representat l'àrea que aquest ocupa i l'àrea extra a la què també s'ha mesurat la fracció d'àrea que ocupen els nuclis activats.	164
Figura 27. Imatge d'un tall de l'amígdala anterior processat per la immunohistoquímica de c-fos (esquerra) i esquema del nivell corresponent de l'atles de Paxinos i Franklin (2003) a la què s'ha mesurat la fracció d'àrea corregida.	165
Figura 28. Imatge d'un tall de l'amígdala posterior processat per la immunohistoquímica de c-fos (esquerra) i esquema del nivell	

corresponent de l'atles de Paxinos i Franklin (2003) a la què s'ha mesurat la fracció d'àrea corregida.	165
Figura 29. Imatge d'un tall de l'àrea amígdalo-hipocàmpica processat per la immunohistoquímica de c-fos (esquerra) i esquema del nivell corresponent de l'atles de Paxinos i Franklin (2003) a la què s'ha mesurat la fracció d'àrea corregida	167
Figura 30. Imatge d'un tall del nucli geniculat lateral processat per la immunohistoquímica de c-fos (esquerra) i esquema del nivell corresponent de l'atles de Paxinos i Franklin (2003) a la què s'ha mesurat la fracció d'àrea.	168
Figura 31. Histograma de barres que representa el temps de quimioinvestigació (mitjana \pm SEM) de les femelles del grup Control i Exposat a un test de preferència).	172
Figura 32. Immunoreactivitat c-fos als diferents nuclis estudiats..	173
Figura 33. Imatge a la què es pot observar a quina regió de l'Illot de Calleja Magne arriben les projeccions des del CoApm.....	174
Figura 34. Expressió de c-fos (mitjana \pm SEM) al GLV, als grups Exposat i Control..	175
Figura 35. Expressió de c-fos (mitjana \pm SEM) al CoApm amb les dades dels dos nivells analitzats agrupades..	177
Figura 36. Expressió de c-fos (mitjana \pm SEM) a l'AHA.....	178
Figura 37. Expressió de c-fos (mitjana \pm SEM) als illots de Calleja Ventromedials, Magne i laterals.	180

Figura 38. Citoarquitectònia dels illots de Calleja.....	196
Figura 39. Vies neurals que mitjançarien les propietats reforçants dels estímuls olorosos (ja foren de caràcter primari o secundari) o vomeronasals.....	202
Figura 40. Estructura d'una MUP.....	213
Figura 41. Esquema que representa la via que seria responsable de codificar les propietats reforçants de les feromones sexuals.....	233
Figura 42. Neuroquímica dels circuits neurals responsables de la preferència per feromones sexuals	236

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1. Correlació entre el temps d'exploració de la feromona masculina i la fracció i la fracció d'àrea a cadascun dels nuclis estudiats.....	188
Taula 2. Anàlisi de les correlacions entre la densitat d'àrea de la immunoreactivitat c-fos dels diferents nuclis estudiat.....	190

PRESENTACIÓ

Aquesta memòria recull el treball realitzat als departaments de Biologia Funcional i Antropologia Física i de Biologia Cel·lular i Parasitologia de la facultat de Ciències Biològiques sota la direcció del Dr. Fernando Martínez García i el Dr. Enrique Lanuza Navarro entre els anys 2004 i 2008.

En aquest treball s'estudia el possible valor reforçant de les feromones sexuals de mascle per a femelles de ratolí, així com els sistemes sensorials responsables de la seua detecció i les àrees neurals implicades en codificar aquestes propietats reforçants.

A la primera secció s'ofereix una **Introducció General** en la qual exposem els antecedents existents a la bibliografia sobre la comunicació intraespecífica mediada per feromones i sobre els estudis existents sobre el paper dels sistemes olfactiu principal i olfactiu accessori en la detecció de feromones, que senten les bases del present treball. A més, presentem les dades prèvies que versen sobre la neuroanatomia del reforç a partir de les quals hem desenvolupat la investigació sobre les bases neurals del reforç per feromones sexuals que es presenta en aquesta tesi.

A continuació, s'assenyalen els **Objectius** de la present tesi.

Al **Capítol 1** exposem el treball realitzat envers la implicació dels sistemes Olfactiu Principal i Olfactiu Accessori en la detecció de feromones.

Al **Capítol 2** presentem els experiments portats a terme per estudiar les propietats reforçants de les feromones sexuals.

Al **Capítol 3** mostrem el treball fet per estudiar la via anatòmica responsable de codificar les propietats reforçants de les feromones sexuals.

A continuació, a la **Discussió General** es discuteixen de manera conjunta els resultats obtinguts al llarg de la realització de la tesi.

Per finalitzar, s'apunten les **Conclusions** fonamentals derivades del d'aquesta tesi i per últim s'ofereix la **Bibliografia** completa utilitzada per a la preparació dels experiments i la discussió dels resultats.

I.INTRODUCCIÓ

GENERAL

I.1 QUÈ ÉS EL REFORÇ?

Alguns estímuls suposen una recompensa de manera innata per als animals, de forma que la seua obtenció o consum produeix plaer i estimula la motivació per obtindre'ls. Com a conseqüència de l'obtenció d'un reforç, la conducta d'un animal es veu modelada o modificada expressant-se de manera distinta en el futur. En altres paraules, el reforç és un dels motors de l'aprenentatge.

El procés del reforç és complex i en ell es distingeixen diferents components, que estan mediatos per estructures cerebrals i neurotransmissors distints i que poden veure's alterats de manera independent (veure Berridge i Robinson, 2003). D'una banda, el fenomen del reforç té un component emocional o afectiu: l'estímul recompensant te propietats hedòniques per a l'animal, és a dir, la seua obtenció o consum produeix plaer (el què en anglès s'anomena *liking*; Wyvell i Berridge, 2000). El plaer o hedònia, com se'l sol designar en la terminologia neurobiològica, en ser una reacció subjectiva, és difícil d'estudiar objectivament. No obstant, en els últims anys hi ha hagut un gran avanç en les investigacions sobre l'hedònia degut a la identificació de respostes motores innates correlacionades amb el plaer, com són les expressions facials induïdes per l'impacte hedònic de certs sabors tant en rates i ratolins

com en ximpanzés, orangutans, mones, i fins i tot humans (Steiner et al., 2001; Berridge 2000).

D'altra banda, al reforç hom distingeix un component motivacional, que té a veure amb el valor que l'animal li atribueix a l'estímul reforçant com a objecte de desig, i que condiciona la motivació per aconseguir-lo, per portar a terme tasques o comportaments més o menys feixugues conduents a l'obtenció d'aquest reforç (el què en anglès s'anomena *wanting*; Wyvell i Berridge, 2000).

Per últim, com ja hem dit, el reforç juga un paper clau en l'aprenentatge. De manera genèrica podem dir que l'obtenció de recompenses modifica el comportament dels animals per tal d'optimitzar les seues respostes futures. D'una banda, els estímuls reforçants desencadenen aprenentatge associatiu del tipus estímul-estímul. Així, pot donar-se una associació entre l'estímul reforçant, que actua com a estímul incondicionat, i els estímuls que l'acompanyen i el prediuen i que poden actuar com a estímuls condicionats. Aquesta associació té com a conseqüència que l'estímul condicionat indueca de manera secundària, apresada, la mateixa resposta que induïa l'estímul incondicionat de manera intrínseca (resposta incondicionada), esdevenint així un reforçant condicionat. Aquest tipus d'associacions entre estímuls s'ajusta al model d'aprenentatge Pavlovià. Al 1927, mentre estudiava el sistema digestiu del gos, Pavlov va observar que un dels animals salivava

com a resposta al so d'una campana (que a priori no induïa aquesta reacció) després que aquest so haguera estat associat a l'obtenció de menjar, el que sí constitueix una recompensa de manera innata i produeix resposta de salivació intrinsecament (Figura 1).

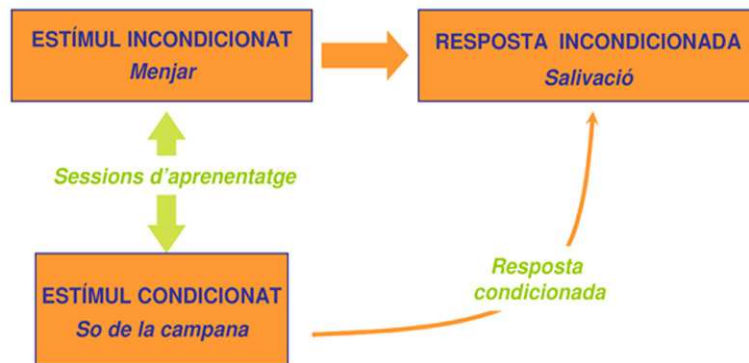


Figura 1. Procés d'aprenentatge associatiu que hauria tingut lloc a l'experiment de Pavlov.

Però a més d'aquesta mena d'aprenentatge associatiu Pavlovià, els estímuls reforçants indueixen altres tipus d'aprenentatge. Tal i com va postular ja Thorndike al 1911 (veure Carlson 1991), en el què ell anomenà "la llei de l'efecte", l'obtenció d'una recompensa incrementa la freqüència i la intensitat del comportament específic que ha resultat en aquesta gratificació. De la mateixa forma, quan l'acció comporta conseqüències negatives disminuirà la taxa en què realitzem aquells comportaments que han comportat aquest càstig. Així, l'experiència ens serveix per modificar els nostres comportaments d'acord amb les seues conseqüències, positives o

negatives. Es tracta d'un tipus d'aprenentatge associatiu en què un estímul és associat amb una resposta, el conegut com aprenentatge associatiu instrumental o estímul-resposta.

Els experiments clàssics dels què deriva gran part del coneixement sobre aprenentatge instrumental són els realitzats per Skinner als anys '50. En aquests, els animals experimentals eren introduïts en una caixa, a la qual hi havia una palanca, la pressió de la qual conduïa a l'obtenció d'una recompensa. La pressió de la palanca per part dels animals és, a priori, un comportament poc probable, però l'obtenció de l'estímul reforçant en pressionar-la incrementa la freqüència i la intensitat en què els animals el realitzen. És a dir, que l'obtenció de la recompensa **reforça** les connexions estímul-resposta, i per tant augmenta la probabilitat que un comportament en principi poc probable s'expressi (Skinner, 1953; veure Carlson 1911; Figura 2).

Per últim, poden ocórrer processos d'aprenentatge més complexos d'aprenentatge lligats al procés del reforç, que inclouen múltiples relacions entre estímuls i accions, que inclouen representacions espacials i temporals declaratives, i relacions predictives i causals que guien els comportaments realitzats amb un objectiu concret (en anglès *goal-directed behaviours*).



Figura 2. Caixa d'Skinner. En aquesta caixa l'animal pot ser exposat a estímuls de distintes naturaleses (luminosos, auditius) que poden ser associats a l'obtenció de menjar o a experimentar una descàrrega elèctrica a través de la reixeta de la base. També hi ha una palanca, la pressió de la qual pot ser reforçada positiva o negativament amb l'obtenció de menjar o amb una descàrrega elèctrica, respectivament. Mòdul per a comportament operant de Panlab, Harvard Apparatus.

Aquest aprenentatge implica processos cognitius molt més complexos que l'associatiu (veure Berridge i Robinson, 2003).

En resum, el reforç és un fenomen complex, al qual podem distingir tres components bàsics: l'hedònia (o el plaer), la motivació i l'aprenentatge, cadascun dels quals està mitjançat per processos i mecanismes cerebrals diferents.

I.II ANATOMIA DEL REFORÇ

Als experiments que es realitzen per a estudiar les vies del reforç generalment s'utilitza com a estímul reforçant menjar o líquids amb sabor dolç. Els resultats d'aquests treballs donen un paper molt important a la projecció dopaminèrgica des de l'àrea tegmental ventral (ATV) fins el nucli accumbens en la codificació del valor recompensant d'aquests estímuls, com veurem en detall a continuació.

I.II.I La hipòtesi clàssica del reforç: Els experiments d'autoestimulació cerebral

En 1954 James Olds i Peter Milner (Olds i Milner, 1954) demostraren que l'estimulació elèctrica de certes regions del cervell podria resultar gratificant. L'objectiu dels seus experiments era estudiar si l'estimulació elèctrica de determinades àrees cerebrals podia influir en l'aprenentatge. En una de les ocasions, però, l'elèctrode va ser implantat i en lloc d'obtenir les respostes d'aversion que sempre obtenien cap a la zona en què l'animal rebia la descàrrega, observaren que aquests "tornaven a per més", com si aquesta estimulació els resultés plaent.

Intrigats per aquest resultat, Olds i Milner implantaren elèctrodes en un grup gran de rates i els permeteren autoestimar-se

elèctricament el cervell en pressionar una palanca a una caixa de test similar a la de la Figura 2. En aquest primer estudi Olds i Milner (1954), arribaren a registrar taxes de resposta (pressió de la palanca) de fins a 700 vegades per hora, la qual cosa demostrava que l'estimulació elèctrica és un reforç molt potent.

Als estudis realitzats a partir d'ací per Olds i els seus col·laboradors ja es demostrà que el comportament d'un animal pot ser reforçat mitjançant l'estimulació de diverses parts del cervell, incloent el tubercle olfactiu, l'escorça prefrontal, el nucli accumbens, el nucli caudat, el nucli putamen, diversos nuclis talàmics, la formació reticular, l'amígdala, l'àrea tegmental ventral, la substància *nigra*, el *locus coeruleus* i el tracte prosencefàlic medial (MFB, de l'anglès *medial forebrain bundle*; Olds i Fobes, 1981). De totes aquestes regions, el substrat del reforç que més intensament s'ha estudiat, tant per Olds i col·laboradors com per altres investigadors, és el MFB. El MFB és un conjunt de fibres entre les quals cursen vies dopaminèrgiques (Dahlstrom i Fuxe, 1964) que transcorren des del cervell mig en direcció anterior cap al prosencèfal rostral. De totes aquestes fibres, les que van des de l'ATV fins l'estriat, i en particular al nucli accumbens (Olds i Fobes, 1981, Wise i Rompre, 1989), semblen les més implicades en el reforç. Les neurones dopaminèrgiques de l'ATV també projecten, però, sobre el septum, certes regions del tàlem, l'amígdala i l'escorça prefrontal (Figura 3)

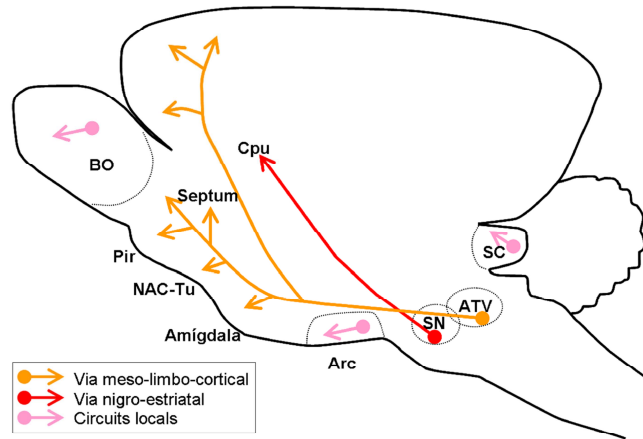


Figura 3. Els sistemes dopaminèrgics s'originen principalment al tegment mesencefàlic. Podem distingir dues vies dopaminèrgiques principals: la via nigro-estriatal, que s'origina a la substància nigra i projecta a l'estriat dorsal, i la via meso-cortico-límbrica, que s'origina en l'àrea tegmental ventral i acaba a l'estriat ventral, septum, amígdala i escorça prefrontal, entre d'altres regions de l'escorça. A més, existeixen nombroses neurones dopaminèrgiques a l'hipotàlem, entre les quals destaquen les neurosecretores del nucli arquejat. Abreviatures: Arc nucli arquejat; BO bulb olfactiu, ATV àrea tegmental ventral; Cpu nuclis caudat i putamen; NAC nucli accumbens; Pir escorça piriforme; SC nucli supraquiasmàtic; SN substància nigra; Tu tubercle olfactiu. Imatge modificada de Carmen Agustín-Pavón, 2008.

Als primers estudis sobre mecanismes del reforç ja es va veure que els efectes reforçants de l'estimulació de la MFB són inhibits per l'acció d'antagonistes de dopamina (Fouriezos i Wise, 1976; Fouriezos et al., 1978; Zarevics i Setler, 1979; Franklin i McCoy, 1979; Gallistel et al., 1982; Gallistel i Karras, 1984; Gallistel i Freyd, 1987) i incrementats per l'acció d'agonistes de dopamina, com la cocaïna i les amfetamines (Wise, 1996), per la qual cosa ja molt

prompte començà a atribuir-se-li un paper molt important a la dopamina com a neurotransmissor del reforç. A més, les lesions del tracte nigro-estriatal deixen els animals adípsics i afàgics (Ungersted, 1971), i els neurolèptics (que antagonitzen l'acció de la dopamina) disminueixen el valor reforçant de les recompenses naturals (menjar) en l'aprenentatge instrumental (Wise et al., 1978; Wise i Schwartz, 1981), el que suggeria que aquesta via era bàsica per al manteniment del valor recompensant del menjar i l'aigua. Per tot això, en 1989, Wise i Rompré proposaren la hipòtesi clàssica sobre el paper de la dopamina en l'*hedònia*, que postulava que l'alliberament de dopamina a l'estriat ventral, en particular al nucli accumbens, des dels terminals tegmentals era la responsable del valor plaent o gratificant dels estímuls. Aquesta hipòtesi va ser reforçada per molts estudis posteriors. Per exemple, l'observació que la microinfusió d'antagonistes del receptor de μ -opioides en l'ATV bloqueja la inducció de l'alliberament de dopamina al nucli accumbens per la ingestió de menjar (Di Chiara i Tanda, 1997) confirmà que aquesta era la via per la que es codificava el valor hedònic del menjar i plantejà la possibilitat que també siga la via per la què es codifica el valor hedònic d'altres reforçants naturals (Figura 4).

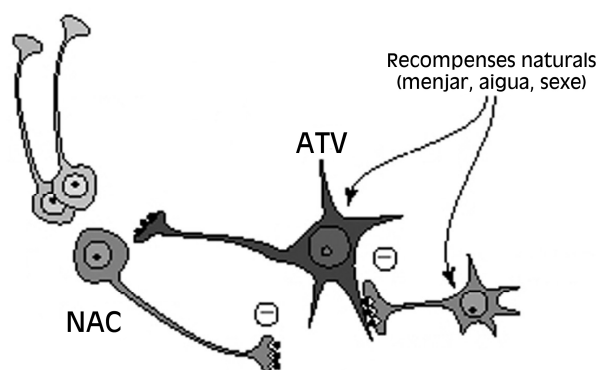


Figura 4. La via tegmento-estriatal clàssica proposada per Wise i Rompre (1989) segons al qual els distints estímuls gratificants estimularien l'alliberament de dopamina des de l'àrea tegmental ventral (ATV) fins el nucli accumbens (NAC). Modificat d'Spanagel i Weiss, 1999.

A més, la majoria de les drogues d'abús influeixen sobre la neurotransmissió dopaminèrgica (Wise i Hoffman, 1992; Wise, 1996b, Wise, 2002; Schultz, 2002). De fet, l'heroïna i altres opiacis, com la cocaïna, les amfetamines i la nicotina originen increments en la concentració de dopamina a l'estriat ventral i l'escorça prefrontal, la qual cosa sembla crítica en el mecanisme d'addicció a drogues.

El fet que les drogues d'abús faciliten la transmissió dopaminèrgica a l'estriat ventral, i en particular al nucli 'accumbens (Di Chiara i Imperato, 1988; Pontieri et al., 1995; Koob, 1992; Figura 5), actuant al propi estriat ventral o potenciant l'activitat de les neurones tegmentals va ser un fet que també contribuï a reforçar la hipòtesi clàssica de l'hedònia de Wise i Rompré del 1989.

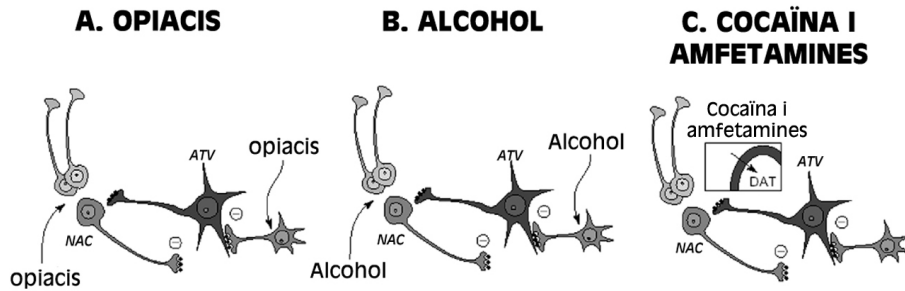


Figura 5. Mecanismes d'acció de les drogues sobre les neurones dopaminèrgiques del sistema mesolímbic. Els opiàcids i l'alcohol incrementen l'activitat dopaminèrgica de manera indirecta (A i B), mentre que la cocaïna i les amfetamines modulen l'acció de la dopamina estímulant l'alliberament o inhibint el transportador de la dopamina (DAT; C). NAC: nucli accumbens, ATV: àrea tegmental ventral. Modificat d'Spanagel i Weiss, 1999.

I.II.II La crisi de la hipòtesi de l'hedònia

Els estudis realitzats durant els últims anys sobre l'anatomia i la fisiologia dels sistemes del reforç han aportat noves perspectives que han qüestionat la hipòtesi clàssica de l'hedònia de Wise i Rompré (1989). D'una banda s'ha vist que les àrees implicades en codificar alguns dels aspectes relacionats amb els processos del reforç inclouen no sols l'àrea tegmental ventral o el nucli accumbens, sinó també d'altres com el còrtex prefrontal medial (Routtenberg i Sloan, 1972) i l'amígdala basolateral (Baxter i Murray, 2002). Aquests, són també nuclis importants en el circuit cerebral del reforç, ja que estan connectats amb l'accumbens i l'AVT, i interconnectats entre ells (Swanson, 1982; Martínez-Hernandez, 2008/9). A més, hi ha indicis

que altres regions de l'estriat ventral, a banda del nucli accumbens són centres del reforç, com el tubercle olfactiu (Ikemoto, 2003).

D'altra banda, el paper de la dopamina com a neurotransmissor del reforç s'està formulant de nou. Els últims treballs sobre la seua implicació en els processos de reforç indiquen que la dopamina no és responsable de la senyalització del valor hedònic dels estímuls, com es creia, sinó que, en canvi, el seu alliberament codifica altres característiques d'aquests tals com la seua novetat o rellevància, o el seu valor com a predictor d'un reforç imminent (veure Wise, 2005 i Schultz, 2007). De fet, hi ha mecanismes de gratificació, parcial o totalment independents de la projecció tegmento-estriatal dopaminèrgica (veure Spanagel i Weiss, 1999; Berridge i Robinson, 2003). S'ha vist que els ratolins mutants per a la tirosina hidroxilasa, incapços de produir dopamina, si són medicats amb cafeïna, són capaços d'aprendre una tasca en laberint per menjar (Robinson et al., 2005).

I.III SEXE I REFORÇ: ESTÍMULS PER L'ATRACCIÓ

INTERSEXUAL

Com es pot concloure de tot el que hem discutit abans, la major part dels estudis sobre els mecanismes de la gratificació es basen en estudis amb estímuls reforçants relacionats amb la ingesta d'aliments (Lepore et al., 1995; Papp, 1988a i 1989; Papp et al.,

1991; Cheeta et al., 1994), la ingestió de líquids (Crowder i Hutto 1992a; Agmo et al., 1993; Perks i Clifton 1997), el sabor dolç (Kelley i Berridge, 2002) o amb drogues addictives.

No obstant això hi ha un altre grup d'estímuls gratificants dels quals es sap poc, però que tenen una gran importància per l'èxit reproductiu dels animals: els estímuls gratificants de caire sexual. De fet, el sexe és clarament reforçant tant en mascles com en femelles (Meissel i Jopa 1994; Meisel et al., 1996; Paredes i Vazquez 1999; Mehrara i Baum 1990; Miller i Baum 1987; Agmo i Berenfel, 1990; Agmo i Gomez, 1993). Estudiar els mecanismes d'aquesta mena de reforç seria interessant perquè permetria reavaluar les hipòtesis prèvies sobre la neurobiologia del reforç.

En el context de la reproducció sexual, la tria de parella constitueix un pas clau per a l'èxit. En les interaccions prèvies al comportament sexual en sí, els animals han d'obtenir la informació necessària per tal d'escollir la parella adequada. Els mascles han de ser capaços d'identificar si una femella pertany a la seua espècie, si és efectivament una femella, si és fèrtil i receptiva i si s'ha reproduït prèviament amb un competidor. Les femelles, a més, han de ser capaces d'esbrinar la qualitat del mascle com a tal, el que vol dir, quin és el seu estatus de dominància.

Una vegada detectada una parella adequada, resulta raonable pensar que a continuació l'individu tracte d'aproximar-se a aquesta.

Així els senyals implicats en la interacció entre congèneres podrien ser atractius i suposar una gratificació, per tal d'afavorir l'aproximació de la possible parella sexual. Per tant, aquests estímuls tindrien un valor afectiu i motivacional que tindria com a funció *reforçar* el comportament d'aproximació i interacció de la parella sexual.

Segons les espècies, els estímuls implicats en la comunicació intersexual, i que podrien tenir valor reforçant, són de diferents naturaleses. En mamífers i aus aquests estímuls són fonamentalment de caràcter visual o auditiu, però en altres espècies, com és el cas dels rosegadors, la comunicació intraespecífica es basa fonamentalment en senyals químics.

Així, algunes de les substàncies químiques que els rosegadors alliberen al medi són percebudes per altres individus de la mateixa espècie als què originen una resposta, ja siga de naturalesa neuroendocrina o comportamental. Aquestes substàncies s'anomenen feromones (Karlson i Luscher, 1959), i aquelles implicades en la comunicació en el context de la reproducció s'anomenen feromones sexuals.

La primera feromona sexual identificada va ser el *bombikol* (Hecker i Butenandt, 1984), una substància alliberada per les femelles de les papallones de la seda (*Bombyx mori*), que constitueix un poderós atraient sexual per als mascles. Aquesta feromona (i potser d'altres)

podria tenir valor reforçant per als mascles de papallona de la seda, de manera que la seua detecció assegurara que el mascle es dirigira cap a la femella.

Donat que els rosegadors són animals macrosmàtics, sembla raonable que als mateixos, l'atracció sexual es pugua basar en feromones sexuals. Si així fora, les feromones sexuals podrien ser els estímuls reforçants de caire sexual que permetrien estudiar els mecanismes cerebrals del reforç utilitzant un estimul de distinta naturalesa als què s'utilitzen habitualment.

Avui en dia, però, no hi ha consens sobre la existència de feromones sexuals en mamífers, ni tan sols en rosegadors (per a una revisió veure Martinez-Garcia et al., 2008).

I.IV FEROMONES SEXUALS EN MAMÍFERS:

REALITAT O FANTASIA?

I.IV.1 És aplicable el concepte de feromona per al cas dels mamífers?

El concepte de feromona ha atret la imaginació de molts científics, i ha originat gran quantitat d'estudis sobre comunicació intraespecífica mitjançada per senyals químics en mamífers. De fet, hi ha una bibliografia extensa sobre caracterització de substàncies a les què se'ls atribueix valor feromonal i de comportaments

l'ocurrència dels quals sembla deguda a la detecció de substàncies químiques en mamífers. Però d'altra banda, també hi ha autors que consideren que donada la complexitat del seu sistema nerviós i del seu comportament, és una simplificació molt greu pensar que el comportament dels mamífers respon a un esquema estímul-resposta tal i com ocorre als insectes, i que per tant és incorrecte extrapolar el concepte de feromona directament d'insectes a mamífers. Aquests autors consideren, per tant, que en el cas d'existir en mamífers, les feromones tindrien, com a molt, un efecte *modificador* del comportament (Bronson, 1976).

Com ja hem exposat prèviament, el concepte de feromona va ser establert per Karlson i Luscher al 1959 per a definir aquelles substàncies que són secretades a l'exterior per un individu i percebudes per un altre individu de la mateixa espècie en el que provoquen una reacció definida, estereotipada, ja es tracte d'un comportament o d'un procés neuroendocrí. Aquesta definició implica que la resposta que ha d'induir una feromona ha de ser innata, no apresada. Per tant, per poder afirmar que una substància és una feromona s'ha de comprovar que la reacció que genera no es deu a experiència prèvia.

Així, l'experiència durant l'edat adulta pot modificar els comportaments induïts per olors, i fins i tot les preferències sexuals (veure Martinez-Garcia et al., 2008). Un exemple és la preferència

adquirida pels mascles cap a olors de femelles en estre com a resultat de l'experiència amb aquestes ja en estat adult (Carr et al., 1965; Doty i Dunbar, 1974; Le Magnen, 1951; Lydell i Doty, 1972). Aquestes preferències secundàries es poden adquirir, també, cap a olors artificials. Per exemple, Kippin i Pfaus (2001a) demostraren que els mascles de rata ejaculen més freqüentment amb femelles impregnades amb una olor (extracte d'ametla) amb la què havien estat impregnades femelles amb les què se'ls havia deixat reproduir-se prèviament.

En conclusió, totes aquestes dades posen de manifest que hi ha substàncies químiques que indueixen una resposta apresada en els individus (perquè el significat de la substància ha estat après per mitjà de l'experiència) i que, per tant, no podrien ser qualificades com a feromones. Però aquests resultats no són suficients per descartar l'existència de senyals que indueixen respostes estereotipades de manera innata (feromones) en mamífers. Més bé fan patent la necessitat de comprovar l'experiència dels animals amb l'estímul que s'estudia o amb altres que podrien modificar el comportament dels animals, per poder assegurar que determinada substància és una feromona.

A banda, certes substàncies que s'han qualificat de feromones semblen no ser les úniques que produeixen l'efecte feromonal o, fins i tot, no ser imprescindibles per produir aquest efecte. Un exemple és

la *copulina*, una “feromona” continguda en les secrecions vaginals de femella del mico rhesus (*Macacus rhesus*) i que indueix comportament copulatori en mascles (Michael i Keverne, 1968, 1970b). En estudis posteriors s’observà que l’eliminació total dels bulbs olfactius no abolia el comportament sexual, per tant, aquest senyal, si contribuïa a què es donara el comportament sexual, no semblava imprescindible, incomplint per tant, la definició de feromona.

En conclusió, actualment existeix un debat sobre si el terme feromona és aplicable per als mamífers i, en cas que ho fora, sobre quina seria la definició exacta del terme feromona, els requisits que hauria de complir una substància per poder qualificar-la com a tal. Alguns autors consideren que els comportaments dels mamífers són massa complexos per poder explicar-los seguint un esquema similar al què s’aplica per als insectes. En qualsevol cas, el què es pot deduir de totes les dades presentades en aquest punt és que per poder qualificar de feromona una determinada substància cal tenir controlats multitud de paràmetres. Entre tots aquests paràmetres, l’experiència prèvia de l’animal amb la possible feromona, o amb altres estímuls que també puguen modificar la seua conducta, és de vital rellevància, tant l’experiència prenatal i neonatal com la què té lloc durant l’edat adulta.

I.IV.II El cas de les feromones sexuals de mascle

Durant els últims anys, al nostre grup hem estudiat la resposta de les femelles de ratolí de la soca CD-1 als senyals químics continguts en la borumballa de mascles en diferents situacions experimentals. Els resultats dels nostres experiments demostren que les femelles de ratolí manifesten una preferència per explorar la borumballa embrutada per mascles front a la borumballa neta (Martínez-Ricós et al., 2007) i front a l'embrutada per altres femelles (Moncho-Bogani et al., 2002) o per mascles castrats (Martínez-Ricós et al., 2007). Les femelles que utilitzem als nostres experiments són el què anomenem femelles *químicament* verges, és a dir, que mai han estat en contacte amb senyals químics procedents de mascles adults. Podem deduir doncs que la resposta que manifesten cap als senyals de mascles contingudes en la borumballa embrutada per aquests als què són exposades és innata, no apresada, no es deu a cap experiència prèvia. Per tant, el comportament de preferència específicament induït per senyals de mascle que observem als nostres tests és una resposta estereotipada innata, genèticament preprogramada.

A més, els nostres resultats indiquen que els senyals cap als què les femelles de ratolí es senten innatament atretes són de naturalesa no volàtil, ja que les femelles solament manifesten aquesta preferència quan poden fer contacte directe amb la borumballa, però no quan aquest es evita mitjançant una plataforma perforada que solament

permet la detecció dels volàtils que emanen d'ella (Moncho-Bogani et al., 2002). Això ens permet aventurar que aquestes feromones són detectades pel sistema vomeronasal, ja que, d'acord amb Wysocki et al. (1980), durant el comportament exploratori els components de baixa volatilitat (com la rodamina) no arriben a l'epiteli olfactiv, però poden entrar a l'OVN, probablement mitjançant mecanismes actius de bombeig (el conegut com *vomeronasal pumping*, un mecanisme de bombeig vascular controlat autonòmicament i que permet transportar els estímuls fins els receptors; Meredith et al., 1980). De fet, l'exposició a borumballa embrutada per mascles activa el sistema vomeronasal (Moncho-Bogani et al., 2005). A més a més, el nostre treball també ha mostrat que malgrat que les femelles no prefereixen els volàtils emanats de la borumballa embrutada per mascles de manera innata, aquests volàtils poden adquirir propietats atractives de manera secundària si les femelles són exposades als volàtils i als no volàtils de manera conjunta durant una sèrie de sessions a les què anomenem *sessions d'aprenentatge*. Aquests resultats ens han portat a proposar la hipòtesi que durant aquestes exposicions repetides a la borumballa embrutada per mascles, té lloc una associació pavloviana entre els senyals masculins innatament atractius, i probablement detectats per l'OVN, (que constituïrien un estímulo incondicionat) i els volàtils, probablement detectats per l'epiteli olfactiv, (que constituïrien un estímulo condicionat (Moncho-

Bogani et al. 2002). Segons aquesta hipòtesi, aquests senyals no volàtils de mascle, tindrien propietats reforçants, la qual cosa, tal i com hem exposat al punt I.I.I, explicaria com un estímul no volàtil, i que per tant no pot ser detectat des de la distància, resultara atractiu.

Per tot això, el nostre treball en conjunt, suggereix que, en el ratolí, el comportament de preferència/exploració de senyals de mascle es deu a la presència en aquestes marques de feromones no volàtils, probablement detectades per l'OVN, i que molt possiblement tindrien propietats reforçants per a les femelles. Es tractaria d'un cas inequívoc d'un comportament desencadenat per feromones en mamífers.

I.V . PAPER DELS SISTEMES OLFACTIU I

VOMERONASAL EN LA DETECCIÓ DE FEROMONES

La majoria dels tetràpods (Eisthen, 1997; Scalia i Winans, 1975), inclosos els rosegadors, tenen dos sistemes sensorials (olfactiu principal i olfactiu accessori o sistema vomeronasal) de característiques i anatomia sensiblement distintes. L'òrgan sensorial del sistema olfactiu principal és la mucosa o epiteli olfactiu (EO), mentre que el del sistema olfactiu accessori és l'òrgan vomeronasal (OVN) o òrgan de Jacobson (Figura 6). Les projeccions de l'EO i

l'OVN al sistema nerviós central acaben en regions semblants però diferenciades del cervell, els anomenats bulb olfactiu principal (BOP), i bulb olfactiu accessori (BOA), respectivament; Figura 6).

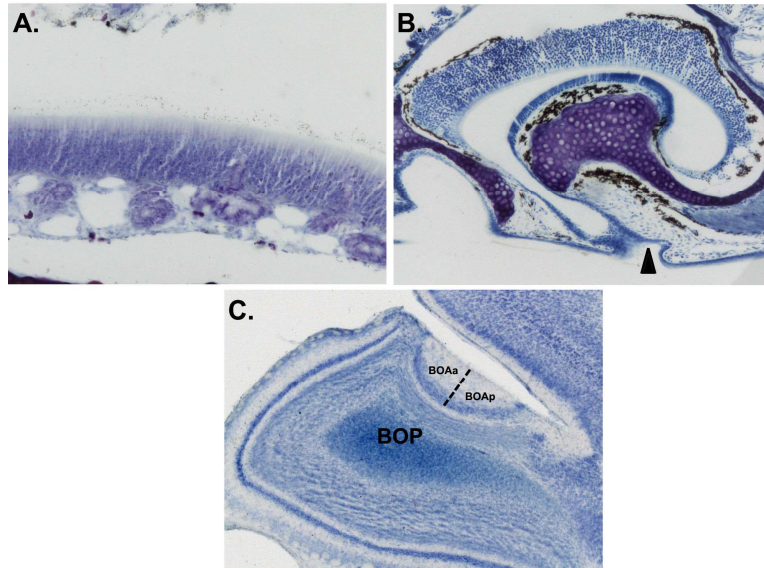


Figura 6. Talls histològics de l'epiteli olfactiu (A) i de l'òrgan vomeronasal o de Jacobson de la sargantana *Podarcis hispanica* (B). L'epiteli olfactiu està obert a les cavitats nasal i bucal i les olors accedeixen a ell durant la respiració. L'òrgan vomeronasal és un sac tancat que en rèptils s'obri a la cavitat bucal (fletxa). Les sargantanes introdueixen l'estímul amb la llengua bífida mitjançant moviments característics de la llengua (*tongue-flick*, en anglès). Altres vertebrats posseeixen mecanismes diferents d'introducció de les olors vomeronasals fins l'òrgan sensorial. C. Tall sagital d'un bulb de ratolí al què es distingeixen la regió que rep projeccions des de l'EO, el bulb olfactiu principal (BOP) i la què rep les projeccions des de l'òrgan vomeronasal, el bulb olfactiu accessori (BOA), que a la seua vegada presenta una regió anterior (BOAa) i una posterior (BOAp).

Per la seua banda, els bulbs olfactius principal i accessori innerven regions distintes dels hemisferis cerebrals (LeGross Clark i Meyer, 1947; Adey, 1953; Scalia, 1966; Winans i Scalia 1970; Raisman, 1972; Price, 1973; Devon, 1976; Skeen i Hall, 1977; David et al., 1978; Turner et al., 1978; Turner i Mishkin, 1976, Kosel et al., 1981; Meyer, 1981; Shammah-Lagnado i Negrao, 1981; Martinez-Garcia et al., 1991; Shipley et al., 2004; Martinez-Marcos i Halpern, 2006; Pro-sistiaga et al, 2007). El BOP projecta al nucli olfactiu anterior (AOL), a les escorces piriforme (Pir) i entorrinal (Ent), al tubercle olfactiu (Tu), a l'amígdala cortical anterior (CoAa) i posterolateral (CoApl) i a les àrees de transició cortico-amigdalina (CxA). D'altra banda, el BOA projecta a l'amígdala cortical posteromedial (CoApm) i a l'amígdala medial (MeA), que a la vegada projecten sobre la divisió posteromedial del nucli de la *stria terminalis* (BST). Recentment el grup del Dr. Martinez-Marcos ha ampliat aquesta descripció clàssica, mostrant convergència de les projeccions olfactivas i vomeronasal a diferents nuclis de l'amígdala (Pro-Sistiaga et al., 2007).

Malgrat que per tot això sembla prou clar que els sistemes olfactiu i vomeronasal són distintes i tenen característiques peculiars, avui en dia encara es manté el debat sobre quina seria la funció de cadascun d'ells en la detecció de feromones, i si el seu paper seria complementari o redundat (Brennan i Zufal., 2006; Kelliher et al., 2006; Restrepo et al., 2004; Zufall i Leiders-Zufall, 2007; Martinez-

Garcia et al., 2008). El supòsit més estès és que el sistema vomeronasal processa senyals implicats en la comunicació intraespecífica, és a dir, feromones i, per tant, el seu paper seria mitjançar reaccions fisiològiques o comportamentals estereotipades en resposta a aquestes feromones. En canvi, el sistema olfactiu principal detectaria olors més generals que informarien els animals sobre l'entorn (veure Martinez-Garcia et al., 2008). Però treballs recents qüestionen la veracitat d'aquesta dicotomia. Per exemple, s'ha vist que l'òrgan vomeronasal detecta substàncies sense valor feromonal (Sam et al., 2001), i que algunes neurones olfatives expressen receptors olfactius detecten de manera específica molècules implicades en la comunicació intraespecífica, com és el cas de la feromona mamària (Hudson i Distel, 1986; Schaal et al., 2003), que és detectada per l'epiteli olfactiu dels conills recent nascuts i indueix la cerca del mugró. També s'ha vist que les neurones de la mucosa olfactiva del ratolí responen de manera específica a volàtils de l'orina de possibles predadors que originen reaccions innates (Kobayakawa et al., 2007), i a una molècula, l'MTMT ((methylthiol)metanethial) present en l'orina de mascle (Lin et al., 2005), el què suggereix que són detectades per receptors específics.

En conclusió, els treballs més recents qüestionen la visió clàssica sobre la funció dels sistemes olfactiu i vomeronasal, i mostren que

ambdós sistemes estan implicats en la comunicació intraespecífica. Ara bé, continua no estant clar si les seues funcions en la detecció de feromones se solaparien o si, pel contrari, serien complementàries.

OBJECTIUS

Objectius de la tesi

1. Estudiar a les femelles de ratolí, si les feromones sexuals masculines atractives contingudes a la borumballa embrutada per mascles són detectades per l'òrgan vomeronasal o, pel contrari, constitueixen un estímul olfactiv.
2. Comprovar igualment, si l'atracció induïda per volàtils de mascle depen de la integritat del sistema vomeronasal.
3. Comprovar si aquestes feromones tenen propietats reforçants per a les femelles de ratolí, és a dir, si es poden utilitzar com a premi per reforçar comportaments.
4. Aprofundir en l'estudi de la via anatòmica que mitjança les propietats reforçants de les feromones sexuals. En concret, estudiarem mitjançant l'anàlisi de l'expressió del proto-oncogen c-fos, si les vies que connecten el cortex vomeronasal de l'amígdala amb l'estriat ventral són activades a les femelles de ratolí com a conseqüència de l'exploració de borumballa embrutada per mascles.

1. CAPÍTULO 1:

Paper del Sistema Vomeronasal en l'atracció intersexual en femelles de ratolí.

1.1 INTRODUCCIÓ

El comportament socio-sexual dels rosegadors es basa fonamentalment en senyals químics. Els mascles i les femelles assenyalen el territori amb marques d'orina (Hurst i Beynon, 2004), fluids vaginals o altres secrecions (Petruilis i Johnston, 1997) per anunciar-se front als seus competidors, però també per tal de comunicar-se amb possibles parelles sexuals (Hurst i Beynon, 2004). Les marques contenen diferents molècules que poden actuar conjunta o separadament com a senyals químics implicats en la comunicació intraespecífica. Aquestes molècules inclouen lipocalines (Cavaggioni et al., 2000), com són les proteïnes principals de l'orina del ratolí (*Major Urinary Proteins*, MUPs; Cheetham et al., 2007; Stopka et al., 2007), les globulines alpha 2u de l'orina de les rates (Beynon i Hurst, 2004) o l'afrodisina del fluid vaginal de les femelles de hámster (Birand et al., 2004). També poden incloure altres proteïnes d'elevat pes molecular secretades per glàndules exocrines (per exemple les glàndules del llagrimall; Kimoto et al., 2005), així com oligopèptids com són aquells associats al complex principal d'histocompatibilitat del tipus 1 (MHC I; Boehm i Zufall, 2006). A més, les marques deixades pels rosegadors contenen volàtils de naturalesa lipídica que probablement estan lligats a les lipocalines (Sharrow et al., 2002). Per tant, els senyals químics utilitzats en la

comunicació intraespecífica poden ser combinacions de molècules altament volàtils i moderadament volàtils, i d'altres involàtils.

La major part dels vertebrats terrestres presenten dos òrgans per a la detecció de substàncies químiques de l'entorn, l'epiteli olfactivu (EO) i l'òrgan vomeronasal (OVN) o òrgan de Jacobson (Jacobson, 1811; Halpern i Martínez-Marcos, 2003).

Com ja hem vist a la introducció general, l'EO i l'OVN projecten a regions distintes del bulb olfactivu, conegudes respectivament com bulb olfactivu principal (BOP;) i bulb olfactivu accessori (BOA;), que tot i mostrar una organització semblant tenen projeccions centrals molt diferents (Figura 7; LeGross Clark i Meyer, 1947; Adey, 1953; Scalia, 1966; Winans i Scalia 1970; Raisman, 1972; Price, 1973; Devon, 1976; Skeen i Hall, 1977; David et al., 1978; Turner et al., 1978; Turner i Mishkin, 1976, Kosel et al., 1981; Meyer, 1981; Shammah-Lagnado i Negro, 1981; Martínez-García et al., 1991; Shipley et al., 2004; Martínez-Marcos i Halpern, 2006; Pro-sistiaga et al, 2007). En mamífers, les neurones mitrals del BOP projecten al nucli olfactivu anterior (AOL), les escorces piriforme (Pir) i entorrinal (Ent), al tubercle olfactivu (Tu), a l'amígdala cortical anterior (CoAa) i posterolateral (CoApl) i a les àrees de transició cortico-amigdalina (CxA). Per la seua part, el BOA projecta a l'amígdala cortical posteromedial (CoApm), i a l'amígdala medial (MeA), que projecten sobre la divisió posteromedial del nucli de la *stria terminalis* (BST). A

la seua vegada, el CoApm projecta sobre els illots de Calleja (ICj), al Tubercle Olfactiu (Tu), a parts de l'escorça del nucli accumbens (NAC shell, en anglès) i del pàlid ventral.

Sistema olfactivu Sistema vomeronasal

Epiteli olfactivu Òrgan vomeronasal

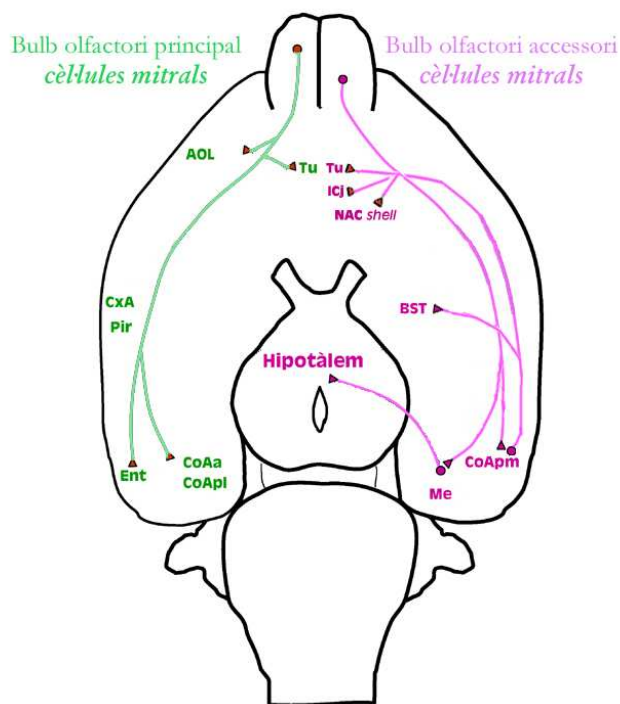


Figura 7. Visió ventral de l'encèfal de ratolí al què es representen les vies olfactives (esquerra) i vomeronasals (dreta). AOL (nucli olfactivu anterior); Tu (tubercle olfactivu); Cxa (àrea de transició corticoamigdalina); Pir (Escorça piriforme); Ent (Escorça entorrinal medial); ICj (illots de Calleja), NAC shell (escorça del nucli accumbens); CoAa (amígdala cortical anterior); CoApl (amígdala cortical posterolateral); CoApm (amígdala cortical posteromedial); MeA (amígdala medial); BST (nucli de la *stria terminalis*).

Es tendeix a pensar que el sistema vomeronasal (Figura 8) està dedicat a la detecció de feromones, és a dir, al processat de senyals implicats en la comunicació intraespecífica, el que donaria lloc a respostes fisiològiques o comportamentals estereotipades, mentre que el sistema olfatiu principal detectaria olors més generals que informarien els animals sobre l'entorn.

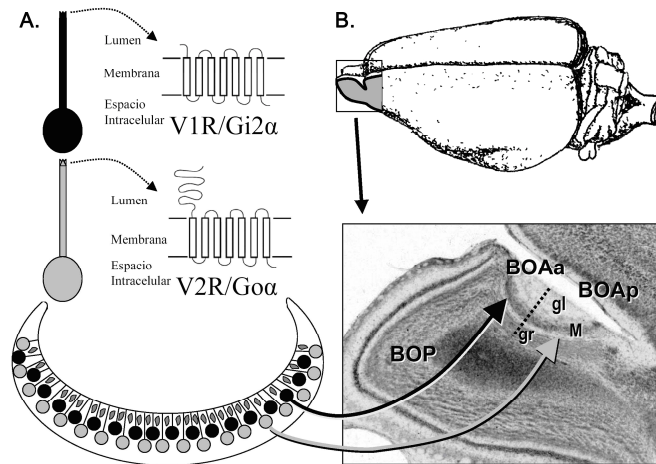


Figura 8. A: Esquema de l'òrgan vomeronasal (OVN) al què s'observa la seua forma tubular característica i les dues poblacions cel·lulars que el formen: la luminal, composta per neurones que expressen receptors de tipus 1 (VR1) associats a la proteïna $Gi2\alpha$, i la capa basal, formada per neurones que expressen receptors de tipus 2 (V2R), associats a proteïna $Go\alpha$. En B es mostra la localització i estructura dels bulb olfatiu accessori (BOA) en un esquema (dalt) i una imatge (baix) d'una secció sagital de l'encèfal del ratolí. Hom pot apreciar que, a diferència del bulb olfatiu principal (BOP) que l'envolta, el BOA és heterogeni i es troba dividit en dues porcions, la anterior (BOAa) i la posterior (BOAp), que reben projeccions específiques de les dues poblacions de neurones vomeronasals (fletxes de A a B). Abreviatures: gl capa glomerular, gr capa granular, M capa de cèl·lules mitrals.

No obstant, les dades experimentals disponibles indiquen que, d'una banda l'òrgan vomeronasal pot detectar substàncies sense valor feromonal (Sam et al., 2001), i d'altra banda algunes feromones són detectades per l'EO. Aquest és el cas de la feromona mamària que origina atracció i recerca del mugró en cadells de conill (Hudson i Distel., 1986, Schaal et al., 2003).

Per tant, el papers que juguen el sistema olfatiu principal i el sistema vomeronasal en la comunicació intraespecífica roman un debat obert. De fet, hi ha molts estudis que han explorat el rol dels dos sistemes en el comportament sexual del ratolí, però els resultats d'aquests treballs resulten parcialment contradictoris. Alguns d'ells indiquen que l'OVN és necessari per a la detecció de possibles parelles sexuals, de manera que la seua eliminació quirúrgica tant en femelles (Keller et al., 2006a) com en mascles de ratolí (Clancy et al., 1984), afecta el comportament sexual, i a d'altres comportaments precopulatoris com les vocalitzacions ultrasòniques dels mascles cap a les femelles (Wysocki et al., 1982). Pel contrari, tant els mascles (Leypold et al., 2002; Stowers et al., 2002), com les femelles (Kimchi et al., 2007) amb delecions genòmiques del canal iònic TRPC2, del que depèn en gran mesura la traducció sensorial a les cèl·lules vomeronasals, mostren un comportament de munta cap a conespecífics incrementat, independentment de quin siga el gènere d'aquests, així com un comportament agressiu (mascle-mascle)

substancialment reduït. Aquests resultats suggereixen que el VNO és responsable de la discriminació de gènere i, per tant, de molts dels comportaments específics de gènere. Malgrat això, la raó per la qual les lesions quirúrgiques de l'OVN disminueixen el comportament sexual, mentre que les “lesions” genòmiques de la funció vomeronasal l'incrementen continua sent difícil d'explicar. En aquest sentit, s'ha suggerit que l'eliminació física de l'òrgan vomeronasal podria resultar en una oclusió de la cavitat nasal (Kimchi et al., 2007), i, per tant, els dèficits comportamentals observats en animals amb l'OVN lesionat serien en realitat conseqüència de que tant la funció vomeronasal com l'olfactiva en resultaren disminuïdes pel procediment quirúrgic.

En ratolins i altres rosegadors, l'atracció intersexual mitjançada per feromones és, probablement, un pas clau en la detecció de possibles parelles sexuals. De fet, els mascles prefereixen els senyals de femella front als d'altres mascles (Pankevick et al., 2004), i viceversa (Moncho-bogani et al., 2002). No obstant, encara no està gens clar si aquests senyals que resulten atractius són detectats pel sistema vomeronasal o per l'olfactiu. Alguns autors indiquen que les lesions de l'OVN resulten en la pèrdua de l'atracció cap a senyals no volàtils (la detecció dels quals requereix del contacte directe amb la font del senyal) de conespecífics del gènere contrari (Pankevich et al, 2004; Keller et al., 2006a). Açò suggereix que l'atracció intersexual

mitjançada per feromones depèn de senyals detectades a través de l'OVN, i que el sistema olfactiu principal jugaria un paper menor en aquest procés, donat que quan el contacte directe té lloc, els estímuls olfactius de segur que són detectats. D'acord amb açò, utilitzant tests de preferència, el nostre grup ha mostrat que les femelles “químicament verges”, que no han tingut cap experiència amb senyals de mascle adult, mostren una preferència clara per explorar borumballa embrutada per mascles front a borumballa embrutada per altres femelles (Moncho-Bogani et al., 2002) o per mascles castrats (Martínez-Ricós et al., 2007; veure Capítol 2). En canvi, aquesta atracció (que és independent dels nivells d'esteroides sexuals de les femelles, Moncho-Bogani et al., 2004) no s'observa quan les femelles exploren la borumballa a través d'una plataforma de metacrilat foradada, de manera que solament tenen accés als volàtils emanats per la borumballa. Això suggereix que els volàtils detectats per l'epiteli olfactiu (Moncho-Bogani et al., 2005) no són atractius per a les femelles químicament verges, malgrat que poden esdevenir secundàriament atractius després de l'aprenentatge induït per l'exposició repetida a la borumballa (permetent el contacte amb la mateixa; Moncho-Bogani et al., 2002; 2005). Una situació semblant s'ha trobat en mascles de ratolí. Així, els mascles són atrets cap a l'orina de femelles (Pankevich et al., 2004) i les lesions de l'OVN anul·len totalment aquesta atracció independentment de si el

contacte amb l'orina es permet o no, el que suggereix que les feromones no volàtils detectades per l'OVN són responsables de l'atracció dels mascles cap a les femelles.

Malgrat aquestes evidències, hi ha altres resultats que semblen contradir-les. Així, Keller et al (2006a) han mostrat que tant les femelles amb l'OVN lesionat com les femelles amb l'OVN intacte mostren atracció cap a volàtils de mascle, mentre que la destrucció de l'epiteli olfatiu suprimeix l'atracció cap a senyals tant volàtils com no volàtils (Keller et al., 2006b). Aquests resultats suggereixen que els volàtils detectats per l'epiteli olfatiu podrien ser essencials per a l'atracció intersexual. D'altra banda, hom ha demostrat que alguns volàtils que estan presents en l'orina de mascle estimulen les neurones vomeronasals *in vitro* (Leinders-Zufall et al., 2000) i que són atractius per a femelles de ratolí (veure Dulac i Torello, 2003), el que sembla indicar que els volàtils detectats per l'OVN podrien mitjançar l'atracció de les femelles cap a senyals de mascle.

En aquest capítol presentem tres experiments que hem realitzat utilitzant femelles "químicament verges" amb la intenció de clarificar aquest tema. En el primer experiment, hem analitzat l'efecte de la lesió bilateral del bulb olfatiu accessori (BOA) sobre l'exploració preferent de les femelles químicament verges cap a la borumballa embrutada per mascles, en tests de preferència on l'enfrontem amb borumballa embrutada per mascles castrats, i als quals les femelles

tenen accés directe a la borumballa. En lesionar el BOA en lloc de l'OVN, estem segurs que els efectes de la lesió no poden ser atribuïts a l'oclusió de la cavitat nasal.

Al segon experiment, estudiarem l'efecte de la lesió sobre l'atracció de les femelles cap a volàtils de mascle, abans i després de l'experiència amb senyals de mascle. Aquest experiment es dissenyà per reexaminar el paper de l'epiteli olfactivu en la detecció dels senyals que resulten innatament atractius per a femelles, així com per tal d'analitzar si el sistema vomeronasal està implicat en l'adquisició de l'atracció cap a volàtils de mascle demostrada en estudis previs del nostre grup (Moncho-Bogani et al., 2002; 2005). Finalment, al tercer experiment, utilitzem un test d'habitució-deshabitució per a estudiar si les femelles amb el BOA lesionat són capaces de detectar les olors de mascle i discriminar-les d'altres olors, descartant així que els efectes de la lesió del BOA siguin atribuïbles a una afectació de la funció olfactiva com argumentava Kimchi et al (2007) per justificar els resultats d'alguns treballs basats en lesions de l'òrgan vomeronasal.

1.2 MATERIAL I MÈTODES I RESULTATS

1.2.1 Generalitats dels Experiments 1 i 2

1.2.1.1 Disseny experimental

Els tests de preferència o d'elecció simple

Als experiments que conformen aquest capítol, realitzem una sèrie de tests d'elecció simple entre dos estímuls (*two-choice tests*), que anomenarem tests de preferència per facilitar la lectura. Aquests tests reben aquest nom perquè els animals tenen accés a dos estímuls distints simultàniament entre els que poden triar. Com a font d'estímuls utilitzem borumballa neta o embrutada per congèneres mascles intactes o mascles castrats. Aquests estímuls són dipositats en dos pots col·locats als costats oposats de la caixa de test. Com que els animals poden moure's lliurement per la caixa de test, poden escollir entre explorar l'estímul que hi ha al pot de la dreta de la caixa o el que hi ha al pot de l'esquerra. Així, podem analitzar l'atracció que cadascun d'aquests estímuls exerceix sobre les femelles comparant el temps que aquestes investiguen cadascun d'ells. A més, amb el control apropiat, podem comparar l'exploració dels dos pots dins del mateix test, o l'exploració del mateix pot contenint diferent tipus de borumballa en tests successius.

Capítol 1. Paper del Sistema Vomeronasal en l'atracció intersexual en femelles de ratolí

Aquests tests es van realitzar en caixes de metacrilat (25 cm d'amplària, 50 cm de llarg i 30 cm d'altura a l'Experiment 1, i de 20 cm d'amplària x 45 cm de llarg x 50 cm d'altura a l'Experiment 2) amb dos recipients de vidre (6 cm diàmetre i 5.5 cm d'altura a l'Experiment 1 i 5 x 12 x12 cm a l'Experiment 2), que contenien uns 13g de borumballa a l'Experiment 1 i uns 30g al 2. Als dos experiments els dos recipients eren col·locats en costats oposats de la caixa (Figura 9).

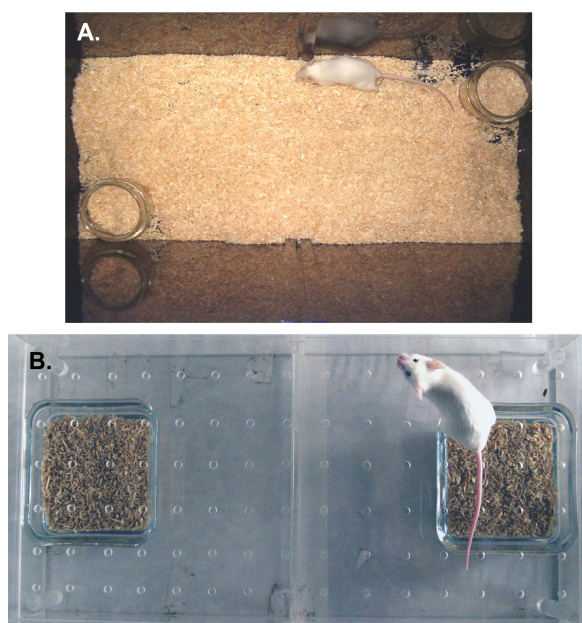


Figura 9. A. Caixa de test a la què realitzàrem els tests d'elecció simple a l'Experiment 1. En aquesta caixa els animals poden fer contacte directe amb la borumballa embrutada (situada als dos pots) durant l'exploració, de manera que poden detectar-ne tant compostos volàtils com no volàtils que la borumballa puga contenir. B. Caixa de test a la què realitzàrem els tests d'elecció simple a l'Experiment 2. En aquest cas vàrem aplicar una plataforma perforada de manera

que els animals no podien contactar amb la borumballa embrutada, i solament podien detectar els volàtils que emanen d'ella.

Prèviament a la realització de cadascun dels experiments, els animals eren habituats tant a la caixa de test com a l'experimentador, amb l'objectiu que el possible estrès que aquesta manipulació poguera originar als animals no influïra el seu comportament durant els tests i, per tant, alterara els resultats. Aquesta habituació consistia en què, durant els 5 dies previs a cada experiment, l'experimentador dipositava els animals a la caixa de test durant 10-15 minuts cada dia. Durant aquesta habituació els dos pots contenien borumballa de mascle castrat.

Després de l'habituació, en tots els experiments es realitzà un test control, amb borumballa de mascle castrat als dos pots, per analitzar si els animals presentaven una preferència prèvia per algun dels dos costats de la caixa. Amb les dades d'aquest test, calculàrem la ràtio del temps que els animal passaven explorant el pot dret relatiu al temps explorant els dos pots, i solament seleccionarem per a les anàlisis posteriors aquells animals que obtingueren un valor entre 0.4 i 0.6 (ambdós inclosos). Aquesta selecció es va fer amb l'objectiu de reduir la variabilitat de la mostra, eliminant aquells animals que durant el test control mostraven un comportament exploratori clarament esbiaixat cap a un dels costats de la caixa. Així, els animals que complien aquest requisit foren sotmesos als tests de

preferència on havien de triar entre borumballa de mascle i borumballa de mascle castrat en diferents condicions segons l'experiment. Tots els tests, tant el control com els de preferència, van ser gravats en vídeo i un observador que desconeixia les condicions dels animals i la borumballa present als pots en cada test va mesurar el temps que els animals passaven explorant cadascun dels pots i una àrea d'1 cm al voltant.

1.2.1.2 Animals

Els animals varen ser tractats en tot moment d'acord amb les pautes del Consell de Comunitats Europees (86/609/EEC) per a l'ús d'animals experimentals. Els procediments varen ser aprovats pel Comitè d'Ètica per a l'Experimentació Animal de la Universitat de València.

Per als experiments d'aquest capítol es feren servir 71 femelles adultes joves (d'entre 9 i 15 setmanes d'edat) de la soca CD-1 que foren criades sense contacte amb cap senyal químic no volàtil procedent de mascles adults, el que anomenem femelles "químicament verges". Per a criar femelles "químicament verges" es va seguir el protocol descrit per Moncho-Bogani et al., (2002), segons el qual s'estabulen femelles prenyades en una sala en la què no hi ha mascles adults. Dinou dies després del part, abans que arriben a la pubertat, les cries són sexades, els mascles retirats de la colònia i les

femelles es mantenen en la mateixa sala fins l'edat adulta quan seran usades en els experiments. D'aquesta manera, l'únic contacte amb mascles que tenen les femelles és amb els seus germans prepúbere. Per tant, aquestes femelles mai estan en contacte amb senyals químics procedents de mascles adults.

Els animals van ser assignats aleatòriament al grup control (lesió *simulada*, grup Simulat) o al grup Lesió (cirurgia amb *lesió*), i cadascun d'ells va rebre la cirurgia corresponent. Després d'almenys una setmana de recuperació, l'experiment començà.

1.2.1.3 Cirurgia i tractament post-quirúrgic

Abans de realitzar la cirurgia, tots els animals foren anestesiats amb pentobarbital sòdic (60 mg/kg i.p) i després se'ls va injectar atropina (0.4mg/kg) intraperitonealment per a reduir la depressió cardiorespiratòria que produeix l'anestèsic. A continuació, eren col·locats en un aparell estereotàxic (David Kopf Instruments 963-A, Tujunga CA, USA) per a dur a terme les lesions. Aquestes es varen fer al BOA, adaptant les coordenades estereotàxiques de l'atles de Franklin i Paxinos (2001) a la soca CD-1. Les coordenades foren: +3.5 anterior bregma, 1mm des de la línia mitja i 1.3mm de profunditat des de la superfície del cervell. Per evitar danyar l'escorça prefrontal que cobreix el BOA, així com el sinus venós que transcorre per sobre del BOA, la lesió del qual suposa un gran risc d'hemorràgia

i mort, introduïrem l'elèctrode des de una posició més rostral i amb un angle de 48°.

Les lesions electrolítiques es van fer passant un corrent constant (negatiu) de 0.8 mA durant 15 s a través d'un elèctrode metàl·lic de 250µm diàmetre, totalment aïllat excepte en els 500 µm de la punta (el generador de corrent i els elèctrodes eren d'Ugo Basile, Comerio, Italy). La cirurgia dels animals del grup Simulat es va fer seguint els mateixos passos i introduint l'elèctrode a les mateixes coordenades, però sense passar cap corrent a través d'aquest.

1.2.1.4 Histologia

Després dels tests comportamentals, les femelles varen ser anestesiades amb pentobarbital sòdic i perfoses amb solució salina, seguida de 75 ml de paraformaldehid al 4% en tampó fosfat 0.01 M (PB de l'anglès *phosphate buffered*) a un fluxe de 5.5 ml/min. A continuació, extraguérem els cervells i els varem sotmetre a post-fixació en el mateix fixador utilitzat durant la perfusió durant 4h. Posteriorment van ser immersos en sacarosa en PBS al 30% fins que s'enfonsaren. A partir d'aquest moment vàrem processar cada hemisferi per separat, per poder analitzar la lesió a cada bulb de manera independent. Així, després de congelar els hemicervells, els tallàrem amb un micròtom de congelació (Microm HM-450, Walldorf, Alemanya) obtenint-ne seccions sagitals de 40µm de gruix.

Recollirem 3 sèries paral·leles de seccions, una de les quals va ser muntada en gelatina al 0.2% en tampó TRIS 0.05M a pH 7.6, assecada a 37°C durant una nit, tenyida amb Nissl, deshidratada i coberta. Una altra sèrie va ser processada per a histoquímica de la diaforasa de la NADPH, muntada deshidratada i coberta. La tercera sèrie va ser congelada en sacarosa tamponada per a possibles usos posteriors. Per a la histoquímica de la diaforasa de la NADPH, incubarem les seccions a 37° durant 2-3 hores en 10 ml de PB 0.1 M amb 15 mg de blau de nitrotetrazoli (Sigma), 15 mg de β -NADPH (Sigma o Boehringer Mannheim) i 300 μ l de Triton-X al 10%.

Un observador que desconeixia la condició Simulada o Lesió de cada animal, va avaluar la grandària i la localització de la lesió de cada bulb de cada femella. Breument, utilitzant una càmera clara, dibuixarem l'àrea que cobrien les capes glomerular i mitral del BOA en cada secció. Els dibuixos van ser escanejats i, després de calibrar les imatges digitals resultants, les vàrem binaritzar utilitzant el software Image J (NIH). Amb aquestes imatges binàries estimarem el volum total d'aquests dues capes per a cada BOA, utilitzant el mètode de Cavalieri (Howard i Reed, 2004). Les femelles del grup Simulat mostraren BOA aparentment intactes. El volum promedi de les capes glomerular i mitral del BOA en les femelles Simulat va ser de $0.168 \pm 0.005 \text{ mm}^3$.

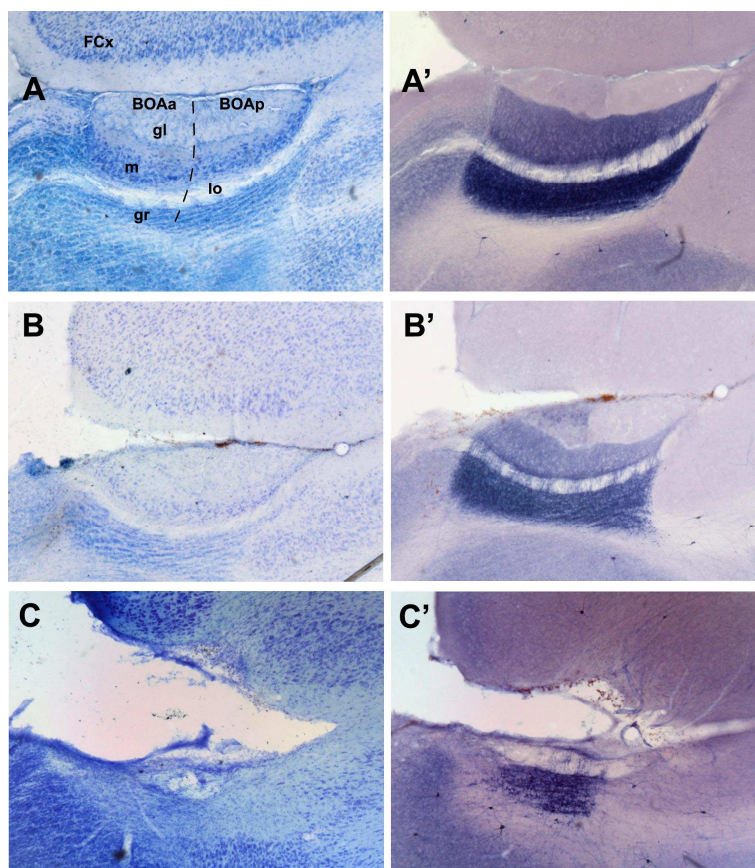


Figura 10. Seccions sagitals de l'AOB d'un animal Simulat (A-A'), i de dues femelles que tenien una lesió menuda (B-B') i gran (C-C'), respectivament. Les seccions de l'esquerra (A,B i C) varen ser tenyides amb blau de toluïdina (tinció de Nissl), mentre que les de la dreta (A', B1 i C') varen ser tenyides per a la histoquímica de la NADPH diaforasa. Aquells animals que presentaren una grandària de lesió com la de la imatge B-B' foren descartat i les seues dades no foren considerades per a les anàlisis posteriors. Abreviatures: FCx: córtex frontal (de l'anglès *frontal cortex*);gl capa glomerular; m capa de cèl·lules mitrals, gr capa granular; lo tracte olfactiu lateral (de l'anglès *olfactori tratc*).

Utilitzant aquesta dada com a referència, al grup Lesió descartarem aquells animals als què solament un dels bulbs estava lesionat i

també aquells que mostraven lesions bilaterals però menudes (que afectaven a menys del 50% de les capes mitral i glomerular en comparació al volum promedi del grup Simulat; Figura 10).

1.2.1.5 Estímuls

Com a font d'estímuls químics es va fer servir borumballa embrutada per mascles, que fou recollida de caixes on hi havia estabulats mascles dominants. Per evitar agressions entre els mateixos, els mascles dominants eren estabulats individualment, i la borumballa es recollia quan els animals havien estat en aquesta gàbia durant 4 dies. A continuació, per assegurar que la borumballa a la què eren exposades les diferents femelles durant el transcurs de tot l'experiment era semblant, es mesclava la borumballa recollida de gàbies de diferents mascles i es congelava a -20° fins el dia del test.

Per obtenir borumballa de mascle castrat, tres mascles adults van ser orquidectomitzats sota anestèsia (pentobarbital, 60 mg/Kg de pes, injecció intraperitoneal). Una vegada recuperats els animals (un mes després de la cirurgia) la borumballa era recollida seguint el mateix protocol explicat anteriorment, llevat que en aquest cas els tres animals eren estabulats en la mateixa gàbia, ja que entre mascles castrats no solen produir-se agressions.

1.2.1.6 Anàlisi de dades

Per a tots els experiments, la primera cosa que es va comprovar va ser si les dades seguien una distribució normal, mitjançant un test de Kolmogorov-Smirnov (i aplicant la correcció de Lillieford). D'altra banda, com ja hem comentat, per a analitzar si els animals exploraven un costat de la caixa més que l'altre al test control, varem comparar el temps explorant cadascun dels 2 pots en aquest test mitjançant una *t* d'Student per a mostres emparellades. Per a analitzar les dades dels tests de preferència es va utilitzar una ANOVA de mesures repetides. En aquesta ANOVA, quan l'esfericitat no podia ser assumida (segons el test de Mauchly) es va aplicar la correcció de Greenhouse-Geisser. En els casos en què els resultats de l'ANOVA ho permetien, analitzàrem els efectes dels factors i les seues interaccions mitjançant les comparacions post-hoc per parelles aplicant-hi la correcció de Bonferroni. També analitzàrem l'efecte de la localització (a dreta o esquerra) de la borumballa estimul sobre l'exploració de la mateixa fent servir una *t* d'Student per a mostres independents. Totes les anàlisis es van fer utilitzant l'SPSS 12.0.1.

1.2.2 Protocol i Resultats Experiments 1 i 2

1.2.1.2 Experiment 1: Efectes de la lesió del bulb olfactiu accessori (BOA) en femelles de ratolí sobre l'atracció innata cap a senyals de mascle.

En aquest experiment testàrem si les feromones contingudes en la borumballa embrutada per mascles, què resulten innatament atractives per a femelles de ratolí, són detectades a través de l'òrgan vomeronasal. Per a la qual cosa lesionàrem el BOA en un grup de femelles (grup Lesió, n=20), mentre que en un altre grup realitzàrem una lesió simulada (grup Simulat, n=21). A continuació, comparàrem la preferència que els grups Simulat i Lesió mostren cap a la borumballa embrutada per mascles.

1.2.1.2.1 Protocol Experiment 1

A continuació de l'habitució i del test control (dia 0, test de preferència entre Mascle Castrat front a Mascle Castrat que abreviem amb l'acrònim MC/MC) tots els animals passaren per un test en el què un dels pots contenia borumballa de mascle castrat i l'altre de mascle intacte. Aquest test permetia valorar la preferència de les femelles cap a la borumballa de mascle quan podien accedir tant als compostos volàtils com als no volàtils donat que se'ls permetia entrar en contacte directe amb la borumballa (test M/MC del dia 0, M de

Masclé, i MC de Masclé Castrat). Amb la intenció d'eliminar un possible efecte del costat en què es presenta la borumballa estímul sobre l'exploració de les femelles sobre la mateixa, a la meitat dels animals de cada grup se'ls presentà la borumballa estímul al pot dret de la caixa i a l'altra meitat a l'esquerra.

D'altra banda, encara que els animals es recuperaren bé de la cirurgia, i tenien una aparença sana, en el moment dels tests semblaven mostrar un comportament exploratori molt variable. Per la qual cosa, tal i com hem detallat anteriorment, descartarem aquells animals que obtingueren una ràtio >0.6 o <0.4 ($n=13$ en el grup Simulat, 6 dels quals amb ràtios >0.6 i 7 amb ràtios <0.4 , i $n=8$ en el grup Lesió, 6 dels quals amb ràtios >0.6 i 2 amb ràtios <0.4).

1.2.1.2.2 Resultats Experiment 1

Després de l'anàlisi histològica de les lesions, en el grup Simulat quedaren 8 animals, mentre que en el grup Lesió 7. Com era d'esperar, el test de la t d'Student mostrà que no hi havia diferència en el temps que els animals passaven explorant el costat esquerre o dret de la caixa al test control (Simulat: $t= 0.282$, $p= 0.781$; Lesió: $t=0.854$, $p=0.404$).

Els patrons de quimioinvestigació dels grups Simulat i Lesió de la borumballa embrutada per mascles o mascles castrats varen ser

comparats mitjançant una ANOVA (Figura 11 A-B) , amb GRUP (Simulat, Lesió) com a factor *entre-subjectes* i TEST (control i test M/MC) i COSTAT (dret i esquerre) com a factors *intra-subjectes*. L'ANOVA mostrà una interacció significativa entre GRUP, TEST I COSTAT ($F_{1,15}=10.012$, $p=0.006$), una interacció significativa entre COSTAT i GRUP ($F_{1,15}=6.640$, $p=0.021$), i un efecte significatiu del factor COSTAT ($F_{1,15}=6.706$, $p=0.021$), així com un efecte quasi significatiu del factor GRUP ($F_{1,15}=4.275$, $p=0.056$) i de la interacció entre TEST i COSTAT ($F_{1,15}=3.870$, $p=0.068$). La resta de resultats de l'ANOVA no varen ser significatius.

Per tant, les femelles del grup Simulat i del grup Lesió mostraren diferents patrons exploratoris cap als dos tipus de borumballa.

La comparació per parelles al grup Simulat (Figura 11A) revelà que la exploració de la borumballa de mascle intacte en el test M/MC era significativament major que l'exploració del mateix pot durant el test control ($p=0.002$) i que l'exploració de la borumballa de mascle castrat que hi havia a l'altre pot durant eixe test ($p=0.002$). En canvi, al grup Lesió (Figura 11B) no hi havia diferències significatives entre el control i el test M/MC ($p=0.539$), ni tampoc entre l'exploració de mascle castrat i mascle intacte dins del test M/MC ($p=0.672$).

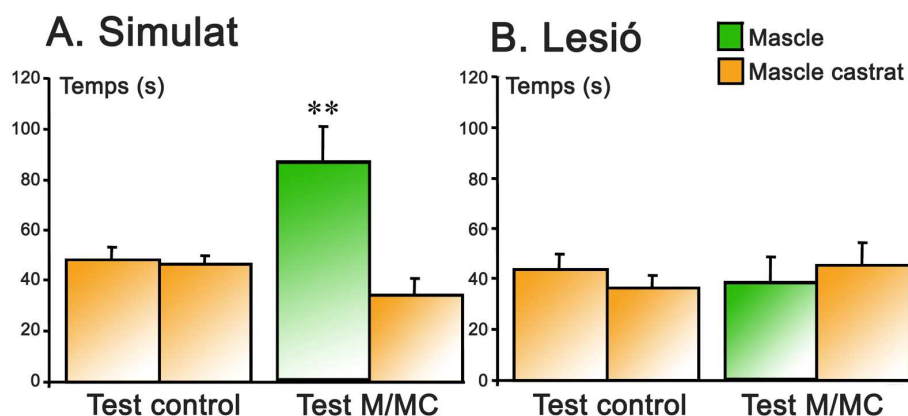


Figura 11. Histograma de barres que representa el temps de quimioinvestigació (mitjana ± SEM) de les femelles dels grup Simulat (A) i Lesió (B) a l'Experiment 1. Tant al test control (borumballa de mascle castrat a tots dos costats, barres de l'esquerra) com al test de preferència (mascle front a mascle castrat, barres de la dreta) els animals podien contactar amb la borumballa. L'anàlisi estadística indica que les femelles del grup Simulat preferiren la borumballa embrutada per mascles intactes, mentre que les femelles amb lesions de l'AOB no mostraren preferència per cap dels dos pots durant el test de preferència (** indica un p valor <0.001, veure text).

En conclusió, aquests resultats indicà que les femelles de ratolí són innatament atretes cap a certa/es feromones continguda/es en la borumballa de mascle intacte, que ja siguin volàtils o no volàtils, són detectades a través de l'òrgan vomeronasal.

1.2.1.3 Experiment 2: Efecte de la lesió del bulb olfatiu accessori (BOA) en femelles de ratolí sobre la quimioinvestigació de senyals volàtils derivades de mascle.

Dades prèvies del nostre grup indiquen que els volàtils de mascle continguts en la borumballa embrutada per mascles no són atractius de manera innata per a les femelles de ratolí, però poden adquirir propietats atractives per associació amb els no volàtils continguts en aquesta borumballa i que sí que els resulten innatament atractius a les femelles (Moncho-Bogani et al 2002). El present experiment es va dissenyar per a comprovar si els estímuls no volàtils innatament atractius que són necessaris per a que es done aquesta associació són detectats per l'òrgan vomeronasal. Per a la qual cosa, primer testàrem la preferència de les femelles dels grups Lesió i Simulat cap als volàtils emanats de la borumballa de mascle en la primera experiència amb els mateixos. A continuació, després de quatre sessions *d'aprenentatge*, durant les quals les femelles tenen accés tant als volàtils com als no volàtils, es va tornar a mesurar la preferència cap als volàtils.

En aquest experiment, i com que es mesura preferència cap a volàtils, després de col·locar els pots amb borumballa a la caixa, es va posar una plataforma foradada sobre els mateixos, de manera que

els animals estaven físicament separats de la borumballa uns 4-5 cm (Disseny Experimental pàgina 55; Figura 9) (veure, i per tant no podien fer contacte directe amb la mateixa, de manera que solament podien detectar els volàtils que emanen d'ella.

Igual que a l'Experiment 1, tots els tests es van gravar en vídeo, però en aquest cas es va mesurar el temps que els animals passaven olorant els forats situats just sobre els pots amb la borumballa.

1.2.1.3.1 Protocol Experiment 2

De forma similar als experiments anteriors, aquest experiment començà amb les sessions d'habitució després de les quals les femelles del grup Simulat (n=11) i les del grup Lesió (n=19) varen ser sotmeses al corresponent test control (MC/MCv; dia 0). En aquestes sigles la v indica que els animals sols podien detectar els volàtils. Igual que a l'experiment anterior, seleccionàrem solament aquells animals que obtingueren una ràtio entre 0.4 i 0.6 al test control. Com a conseqüència, descartàrem animals tant del grup Simulat (n=5, 3 amb valors <0.4 i 2 amb valors >0.6) com del grup Lesió (n=5, amb valors <0.4 i 3 amb valors >0.6).

El mateix dia (dia 0), realitzàrem un test per a analitzar la preferència de les femelles cap a volàtils emanats per la borumballa de mascle intacte en la seua primera experiència amb ells (mascle intacte *vs* mascle castrat). Com que les femelles no tenien cap

experiència amb senyals de mascle quan es va realitzar aquest test, utilitzem la notació (M/MC)_{vi} per a aquest test, on la *i* indica la condició d'*inexpertes* de les femelles. Durant els següents 4 dies (dies 1 a 4) els animals varen ser sotmesos a una *sessió d'aprenentatge* diària de 10 minuts cadascuna. En aquestes sessions, les femelles eren exposades a borumballa embrutada per mascle de manera que podien entrar en contacte amb ella, facilitant l'associació volàtils-no volàtils mitjançant la qual les femelles adquireixen preferència condicionada cap als volàtils de mascle. Amb la intenció d'evitar qualsevol associació de les senyals de mascle amb el context en què les femelles eren exposades a aquests senyals (Martinez-Ricos et al 2007), les *sessions d'aprenentatge* es realitzaren en una sala diferent a aquella en la què es realitzaven els tests, i en una caixa distinta (14 cm d'amplària x 14 cm de llargària x 28 cm d'altura).

El dia següent a aquestes *sessions d'aprenentatge* (dia 5), testàrem una altra vegada la preferència de les femelles cap a volàtils de mascle. Aquest és el test (M/MC)_{ve}, on la *e* indica que les femelles ja tenien experiència amb senyals de mascle.

Igual que a l'experiment anterior, tant al test MC/M_{vi} com al (M/MC)_{ve}, la meitat dels animals trobaren la borumballa de mascle intacte a la dreta i l'altra meitat a l'esquerra. Amb això podem descartar qualsevol efecte de la localització del pot sobre la investigació dels estímuls.

A més, després de tots els tests, tant els animals del grup Simulat com els del Lesió, varen ser exposats a un test MC/M (dia 5, mascle intacte *vs* mascle castrat amb contacte directe) per tal de confirmar l'efecte de la lesió sobre la preferència cap a les feromones de mascle no volàtils.

1.2.1.3.2 Resultats Experiment 2

Després dels tests comportamentals es va dur a terme l'anàlisi histològica per verificar el tamany i la localització de les lesions. Utilitzant els mateixos criteris que a l'Experiment 1 vàrem descartar 5 animals del grup Lesió perquè les lesions eren massa xicotetes o unilaterals. Per tant, finalment analitzàrem les dades de tots els animals del grup Simulat (n=6) i de 9 animals del grup Lesió.

Com cabia esperar, el test de la t d'Student indicà que, al test control, les femelles dels dos grups mostraven una exploració equilibrada de la caixa (Simulat: $t= 0.147$, $p=0.2$; Lesió; $t=0.113$, $p>0.9$). Per a analitzar les dades es va fer una ANOVA per a mesures repetides amb GRUP (Simulat, Lesió) com a factor *entre-subjectes* i TEST (control, test (M/MC)_{vi} i test (M/MC)_{ve}) i COSTAT (dret i esquerre) com a factors *intra-subjectes*. El test de Mauchly revelà que algunes de les dades no eren esfèriques i, per tant, es va aplicar la correcció de graus de llibertat de Huynh-Feldt. L'ANOVA mostrà una interacció significativa entre GRUP x TEST x COSTAT ($F_{1,55}$,

$_{20,14}=4.875$, $p=0.026$), així com l'efecte significatiu del factor TEST ($F_{2,26}= 7.676$, $p=0.002$), mentre la resta de factors i interaccions no eren significatives ($p>0.1$). Açò indica que, globalment (considerant de manera conjunta els grups Lesió i Simulat), no hi ha diferència en el comportament quimioinvestigatori entre els tests. Això no obstant, els animals dels grups Simulat i Lesió mostren patrons d'exploració de les borumballes de mascle i mascle castrat diferents.

Aquestes diferències varen ser explorades mitjançant les comparacions per parelles aplicant la correcció de Bonferroni. Els resultats d'aquestes comparacions (Figura 12A-B) indiquen que l'efecte significatiu de TEST es deu a què les femelles, independentment del grup al què pertanyen, mostren un comportament quimioinvestigador superior al test (M/MC)_{vi} que als tests control ($p=0.02$) i al test (M/MC)_{ve} ($p=0.024$). D'altra banda, l'anàlisi de la interacció GRUP x TEST x COSTAT indica que al test (M/MC)_{vi} les femelles del grup Simulat no mostren cap preferència per cap dels dos costats ($p>0.9$; Figura 12A), mentre que les lesionades mostraren una preferència quasi significativa cap als volàtils derivats de la borumballa de mascle intacte ($p=0.08$; Figura 12B).

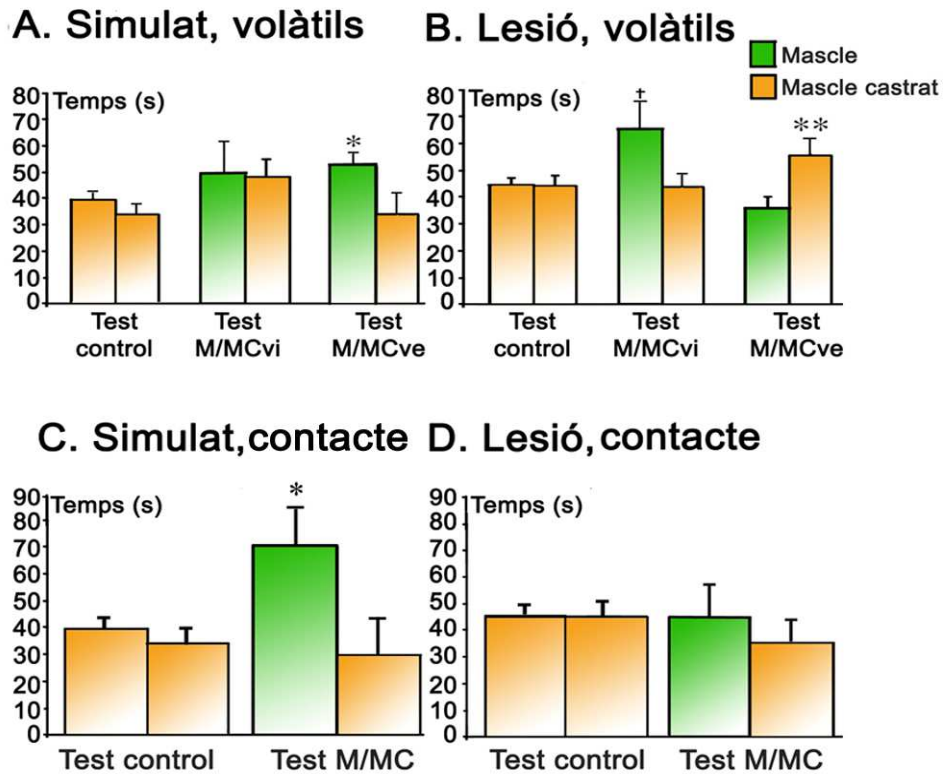


Figura 12. Histograma de barres del temps de quimioinvestigació observat a les femelles del grup Simulat (A,C) i a les femelles amb l'AOB lesionat (B,D) durant l'Experiment 2. Les dues barres de l'esquerra de cada histograma mostren els resultats del test control, mentre que les restants representen els resultat dels tests de preferència mascle vs mascle castrat. Els panells superiors (A i B) mostren els resultats dels tests de preferència de volàtils (on els animals no poden tocar la borumballa) abans (barres del mig, test M/MCvi) i després de l'experiència repetida amb borumballa embrutada per mascles (barres de la dreta, test M/MCve). Les anàlisis estadístiques (veure el text) mostren una clara diferència entre el comportament exploratori de les femelles Simulat i Lesió. Els panells inferiors mostren el comportament de les femelles Simulat i Lesió en un test de preferència al què es permet el contacte directe. Com a l'Experiment 1, les femelles amb l'AOB lesionat no prefereixen la borumballa embrutada per mascles (D), mentre que les Simulat si (C). Els següents símbols representen els diferents valors de p a les anàlisis post-hoc: + p<0.1; † p<0.05; **, p<0.001.

Açò suggereix que, en absència d'un sistema vomeronasal funcional, hi ha una tendència a compensar aquesta carència, incrementant la investigació d'estímuls nous, com són els volàtils de mascle.

Malgrat això, la diferència més clara entre grups es troba al test (M/MC)_{ve}. De fet, mentre al test (M/MC)_{ve} les femelles del grup Simulat prefereixen clarament els volàtils derivats de la borumballa de mascle intacte ($p=0.029$), les femelles Lesió exploren de manera preferencial els volàtils derivats de la borumballa de mascle castrat ($p=0.007$). Aquest resultat suggereixen que les sessions d'*aprenentatge* tenen efectes oposats als dos grups. Les femelles del grup Simulat adquireixen una preferència cap als volàtils derivats de mascle, mentre que les femelles lesionades semblen desenvolupar una aversió cap a ells (comparar Figura 12A i B). Aparentment, en absència d'*input* vomeronasal, l'exposició repetida a orina i excrements de mascle i en les condicions de les nostres sessions d'*aprenentatge* podria desencadenar aversió per la seua olor en les femelles. En canvi, quan les femelles són capaces de detectar els estímuls vomeronasals, les propietats intrínscament reforçants doten als volàtils associats de propietats atractives. De fet, el test M/MC que es va realitzar al final d'aquest experiment indica que, igual que a l'Experiment 1, quan el contacte amb la borumballa es permès, les femelles del grup Simulat mostren una clara preferència cap a la borumballa de mascle (Figura 12C; t d'Student's per a

mostres emparellades, $t=2.38$, $p=0.032$), mentre que les femelles del grup Lesió no ho fan (Figura 12D; $t=0.72$, $p=0.246$).

1.2.3 Experiment 3: Efectes de la lesió del bulb olfactiu accessori (BOA) sobre la funció olfactiva.

1.2.3.1 Generalitats

Amb la intenció d'estudiar la possibilitat que les femelles Lesió foren incapaces de detectar els volàtils derivats de la borumballa de mascle, degut a que la lesió del BOA podria estar induint anòsmia, decidirem analitzar la funció olfactiva tant a les femelles Lesió com a les del grup Simulat. Per a la qual cosa, realitzarem test d'habitució-deshabitució, en els què les femelles havien de discriminar dues olors diferents, una de les quals era orina de mascle i l'altre un terpé sintètic, el geraniol (Ger, Ventos S.A, distribuïdor de International Flavor Fragrances, Barcelona), sense cap significació biològica aparent pels ratolins.

1.2.3.1.1 Animals

En el moment en què aquest experiment es va realitzar, totes les femelles de l'Experiment 1, excepte 4, havien estat processades histològicament. Per tant, per a aquest test es feren servir totes les femelles de l'Experiment 2 (6 del grup Simulat i 9 del grup Lesió) més

les 4 femelles de l'Experiment 1 (totes del grup Simulat). Açò fa un total de 10 femelles al grup Simulat i 9 al grup Lesió.

1.2.3.1.2 Orina

L'orina va ser recol·lectada de 6 mascles adults de la soca CD-1. Per a aquesta recol·lecció, els mascles eren sostinguts pel coll i l'orina era recollida amb un vial de plàstic i congelada en alíquotes de 30 µl. El dia del test, es descongelaven les alíquotes necessàries immediatament abans del seu ús (Baum i Keverne, 2002).

1.2.3.2 Disseny Experimental i Protocol

Aquest experiment es va fer en una caixa de metacrilat (25 x 25 x 15 cm) amb un forat a uns 8 cm d'altura, a través del qual s'introduïa un cotó impregnat amb un odorant (Figura 13).



Figura 13. Caixa utilitzada per als experiments d'habitació-deshabitació.

Els animals eren introduïts a la caixa i, després de 5 minuts d'habitució a la mateixa, eren exposats a 6 presentacions consecutives d'un minut d'un cotó impregnat amb aigua (presentacions 1-6), seguides de 6 presentacions d'1 minut d'un cotó impregnat amb l'olor A (Geraniol o orina de mascle; presentacions 7 a 12) i sis presentacions de l'odorant B (orina de mascle o Geraniol; presentacions 13 a 18). El número d'animals en què la primera olor era orina i la segona Ger i el número d'animals en què l'ordre era l'invers es va equilibrar.

Els tests d'habitució-deshabitució també van ser gravats en vídeo i un observador que desconeixia la identitat dels odorants i les condicions experimentals de les femelles, va mesurar el temps que els animals passaven olorant de manera activa el cotó (a menys d'1 cm del mateix) al llarg de les diverses presentacions.

1.2.3.3 Anàlisi de dades i Resultats

Per tal d'analitzar les dades del test d'habitució-deshabitució generarem una variable que directament estimava la detecció dels dos estímuls. D'una banda, obtindrem l'increment en la investigació induït pel primer estimul restant el temps d'exploració de l'última presentació d'aigua al temps d'exploració de la primera presentació de la primera olor (orina de mascle o Ger; presentació 7 menys presentació 6). De la mateixa manera obtindrem un valor

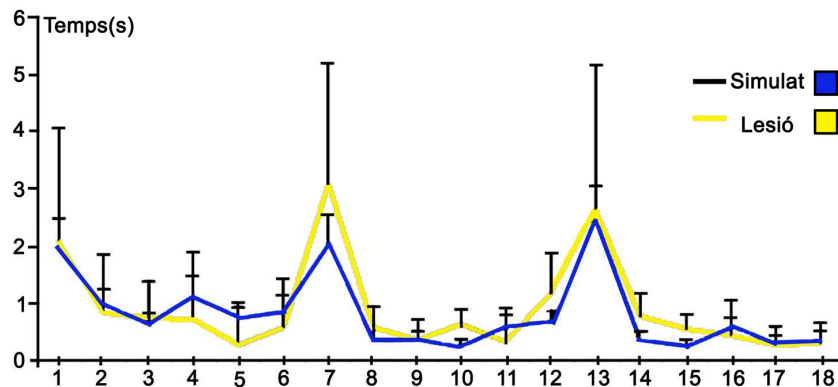
indicatiu de l'increment en la exploració induït per la segona olor restant el temps d'exploració de la última presentació de la primera olor al temps d'exploració de la primera presentació de la segona olor (presentació 13 menys presentació 12).

Com que l'ordre de presentació dels estímuls estava equilibrat, primer analitzàrem l'efecte de la lesió en la detecció de les dues olors mitjançant una ANOVA per a mesures repetides amb el factor ordre de l'Estímul (Primera i Segona olor, independentment de quina fora l'olor en particular) com a factor *intra-subjectes* i Grup (Simulat i Lesió) com a factor *entre-subjectes*. A més, varem fer una segona ANOVA per a mesures repetides amb Olor (orina de mascle o Ger, independentment de l'ordre en què varen ser presentades) com a factor *intra-subjectes* i Grup (Simulat i Lesió) com a factor *entre-subjectes*, per a analitzar si la lesió tenia efectes diferents en la detecció de les dues olors presentades.

A continuació, es va fer una t d' Student per a estimar si les femelles realment detectaven les olors, és a dir, si l'increment en la investigació induït per les olors diferia de zero.

Tant les femelles del grup Simulat com les del grup Lesió mostraren un increment en la investigació de les dues olors després de l'habitució a l'olor anterior (Figura 14).

A. Test d'habitució-deshabitució



B. Primera olor vs segona olor

C. Geraniol (Ger) vs Orina de mascle (mascle)

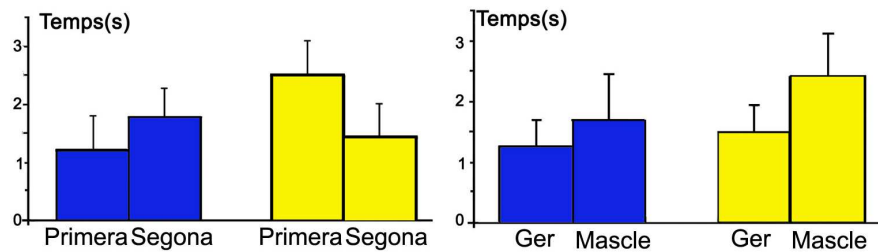


Figura 14. A. Temps d'investigació (mitjana \pm SEM) de les femelles dels grups Simulat i Lesió durant les 18 presentacions consecutives d'olors del test d'habitució.-deshabitució a l'Experiment 3. Durant les 6 primeres presentacions té lloc habitució, però en presentar la primera olor s'observa deshabitució (presentació 7). Aquesta es seguida per una nova habitució durant les presentacions 6-12, i una nova deshabitució té lloc quan es presenta la segona olor (presentació 13). B. Histograma de barres que mostra l'increment al temps d'investigació (mitjana \pm SEM) deguda a la deshabitució induïda per la primera i la segona olor als grups Simulat i Lesió. No apareixen diferències significatives degudes al grup o l'olor. C. Histograma de barres que mostra l'increment al temps d'exploració (mitjana \pm SEM) induït pel geraniol i l'orina de mascle als animals del grup Simulat i Lesió. La lesió de l'AOB no afecta la capacitat de les femelles per discriminar les dues olors entre sí.

L'ANOVA d'aquests increments mostrà que no hi havia efectes significatius ni del factor GRUP ($F_{1,17}=0.725$, $p=0.406$), ni del factor Ordre de l'Estímul ($F_{1,17}=0.124$, $p=0.729$), així com que la interacció Ordre x Grup tampoc no era significativa ($F_{1,17}=1.545$, $p=0.231$) (Figura 14B i Figura 14C). Com era d'esperar, la segona ANOVA, també mostrà una falta d'efecte del factor Grup. A més, no hi havia efecte del factor Olor ($F_{1,17}=1.04$, $p=0.321$) ni de la interacció Olor x Grup ($F_{1,17}=0.127$, $p=0.726$) (Fig. 10C). Com que no hi havia diferència entre el comportament dels grups Simulat i Lesió, agruparem les dades dels dos grups i calculàrem una t d'Student per a una mostra comparant l'increment en la investigació induït per cada estímul respecte de zero. En tots els casos (primera olor, segona olor, orina de mascle, geraniol), l'increment en la quimioinvestigació va resultar significativament diferent de zero ($p \leq 0.001$).

Aquests resultats indiquen clarament que les femelles del grup Simulat i Lesió detecten i discriminen els dos estímuls de forma similar. Per tant, la lesió del BOA no va tindre cap efecte sobre la capacitat de les femelles de detectar l'olor de l'orina de mascle, presumiblement deguda a compostos volàtils, ni de diferenciar-lo d'altres olors

1.3 DISCUSSIÓ

1.3.1 L'OVN detecta les feromones sexuals de mascle responsables de l'atracció intersexual

Molts mamífers, incloent rosegadors, utilitzen senyals químics per tal de localitzar conespecífics i per identificar-ne el gènere, la identitat, l'estat hormonal o l'estatus social i, fins i tot, l'estat de salut (veure Vosshall, 2005). Avui en dia, no hi ha consens general sobre el paper que juguen el sistema vomeronasal i olfactiu en aquests processos (Restrepo et al., 2004). El que s'accepta de manera general és que els adults poden identificar el gènere d'un conespecífic simplement olorant la borumballa embrutada per aquest, o la seua orina. Però, a més, els senyals químics procedents de conespecífics del gènere contrari semblen implicats en l'atracció intersexual. De fet, els mascles de ratolí investiguen més intensament la borumballa embrutada per femelles (Baum i Keverne, 2002; Pankevich et al., 2004) que l'embrutada per altres tipus de conespecífics. De la mateixa manera, les femelles adultes exploren de forma preferent els senyals de mascle continguts en orina o en borumballa embrutada per mascles (Drickamer, 1989; Mossman and Drickamer, 1996; Mucignat-Caretta et al., 1998), quan aquesta es confrontada a l'embrutada per altres femelles (Moncho-Bogani et al., 2002) i per mascles castrats (Martínez-Ricós et al., 2007; veure Capítol 2). A

més, les femelles adultes són “atretes” per senyals continguts en la borumballa embrutada per mascles, fins i tot quan no han tingut cap contacte previ amb aquests senyals, al ser criades en absència de cap secreció o excreció de mascles adults (Moncho-Bogani et al, 2002). Per tant, l'atracció que les femelles adultes mostren cap a senyals químics de mascles no és deguda a una experiència prèvia, ja siga sexual o “química” (Moncho-Bogani et al, 2002; 2005; Martínez-Ricós et al, 2007), no és apresada, sinó incondicionada o, si es vol, innata. Aquests senyals compleixen completament, per tant, les característiques definitòries de les feromones sexuals (Karlson i Luscher, 1959; veure Martínez-Garcia et al., 2007).

Un fet de gran rellevància és que, com els resultats dels test amb femelles del grup Simulat de l'experiment 2 indiquen, aquesta atracció no s'observa en tests de preferència similars en els què les femelles sols poden detectar els volàtils que deriven de la borumballa (Moncho-Bogani et al., 2002; Martínez-Ricós et al., 2007). Aquests resultats indiquen que les feromones atractives són no volàtils o contenen algun element no volàtil d'importància crítica. D'acord amb Wysocki et al. (1980), durant el comportament exploratori els components de baixa volatilitat (com la rodamina) no arriben a l'epiteli olfactiu, però poden entrar a l'OVN, probablement mitjançant mecanismes actius de bombeig (el conegut com *vomeronasal pumping*, Meredith et al., 1980). Açò suggereix que les feromones

sexuals de mascle que són responsables de l'atracció intersexual són detectades per l'OVN.

Malgrat això, dades recents també apunten que alguns senyals químics de baixa volatilitat (com són els pèptids de tipus MHC 1) poden ser detectats tant per l'epiteli olfactiu (Spehr et al., 2006) com per l'OVN (Leinders-Zufall et al., 2004). A més, utilitzant tècniques d'electrofisiologia i la detecció de calci intracel·lular amb fluoròfors *in vitro*, s'ha vist que les cèl·lules de l'OVN responen a certs components volàtils de l'orina (Leinders-Zufall et al., 2000; Sam et al., 2001). En algun cas, fins i tot, s'ha identificat el receptor vomeronasal (de tipus VR1) responsable de la detecció d'un compost volàtil de l'orina de mascles (la 2-heptanona, Boschat et al., 2003). No obstant, l'epiteli olfactiu també detecta aquests volàtils (Wang et al., 2006). Per tant, la qüestió de si les feromones no volàtils sexuals de mascle són detectades per l'OVN de les femelles era una qüestió que quedava oberta.

Els resultats d'aquest treball mostren clarament que és necessari un sistema vomeronasal funcional per tal que les femelles de ratolí siguen atretes cap a la borumballa de mascle, el que indica que és l'OVN de les femelles i no l'epiteli olfactiu, el responsable de la detecció de les feromones atractives. Una altra possible explicació per als nostres resultats seria una completa anòsmia de les femelles causada per la cirurgia (veure Kimchi et al., 2007). Aquesta

possibilitat queda, però, totalment descartada, atesos els resultats de l'Experiment 3, que indiquen que les femelles amb el BOA lesionat i les femelles amb el BOA intacte mostren una capacitat similar per a detectar senyals volàtils de mascle, així com per a discriminar-les d'altres olors.

1.3.2 El sistema vomeronasal i la identificació de gènere

La identificació del gènere dels conespecífics és una qüestió clau per assegurar la supervivència i la reproducció a totes les espècies. En rosegadors, aquest procés es basa, fonamentalment, en la detecció de senyals químics, mentre que els estímuls de tipus visual o auditiu tindrien un paper menor (Stowers et al., 2002). De fet, la lesió dels bulbs anul·la totalment el comportament sexual (Powers i Winans, 1975) i, a més, si s'impregna un mascle castrat amb orina de mascle intacte, s'observa com altres congèneres manifesten el comportament de gènere apropiat cap a mascles (Stowers et al., 2002), sense que hi haja influència d'estímuls de cap altra modalitat sensorial.

La qüestió, però, de la importància relativa dels sistemes olfactiu i vomeronasal en el procés d'identificació de gènere encara roman oberta.

En aquest sentit, els nostres resultats, i els d'altres, indiquen que els senyals responsables de la identificació de gènere són detectats pel

sistema vomeronasal, ja que la inactivació total o parcial del sistema vomeronasal provoca alteracions significatives dels comportaments dependents de gènere, entre ells el comportament sexual.

L'atracció que exerceixen els senyals de mascle sobre les femelles (Moncho-Bogani et al., 2002) es pot considerar com un comportament paracopulatori en el sentit que constituiria el primer pas en la recerca de la parella sexual. Els resultats del present treball indiquen que la preferència que les femelles mostren cap a la borumballa embrutada per mascles es deu a la detecció de certes feromones a través de l'òrgan vomeronasal, ja que les femelles amb el BOA lesionat encara que detecten certs senyals de mascle, perden la preferència per la borumballa embrutada per mascles. De manera similar, el treball de Pankevich et al., (2004) mostra que la lesió quirúrgica de l'òrgan vomeronasal als mascles de ratolí elimina la preferència per orina de femella en estre (front a orina de mascles) que si mostren els mascles no lesionats.

Molt probablement, és aquesta incapacitat de detectar les feromones sexuals atractives el que explica que l'eliminació quirúrgica de l'OVN disminuïska substancialment el comportament de lordosi en femelles de ratolí (Keller et al., 2006a) i elimine quasi completament la còpula (Clancy et al., 1984) i diverses respostes precopulatòries dels mascles envers les femelles. Per exemple, els mascles de ratolí amb lesions de l'OVN deixen de mostrar vocalitzacions ultrasòniques (Wysocki et al.,

1982) i increments en els nivells de testosterona (Wysocki et al., 1983) en resposta a les femelles. En línia amb aquestes dades, la deleció d'un grup de 16 gens per a receptors vomeronasals V1R resulta en una disminució global, a llarg termini, del comportament sexual de mascles cap a femelles (Del Punta et al., 2002).

Pel contrari, el comportament dels ratolins TRPC2^{-/-}, mutants afuncionals del canal iònic TRPC2, del que depèn en gran mesura la transducció sensorial a les cèl·lules vomeronasals, es molt diferent del observat als ratolins amb lesions de l'OVN o el BOA en l'edat adulta. Així, els mascles TRPC2^{-/-} mostren un comportament sexual aparentment normal cap a femelles, però en canvi mostren un comportament de munta cap a altres mascles anormalment alt (Leypold et al., 2002; Stowers et al., 2002) i, a més, no deixen de muntar altres mascles ni després de tenir experiència sexual amb femelles (Leypold et al., 2002), com ocorre en animals normals (Del Punta et al., 2004). Per la seua banda, les femelles TRPC2^{-/-} mostren comportaments de munta, moviments pèlvics, investigació anogenital i vocalitzacions ultrasòniques cap a altres femelles (Kimchi et al., 2007). El comportament d'agressió també es veu dràsticament reduït per la lesió genòmica del canal TRPC2, tant als mascles (agressió mascle-masclé; Stowers et al., 2002; Leypold et al., 2002), com a les femelles (agressió maternal; Kimchi et al., 2007). Reduccions similars en l'agressivitat s'han observat també en animals als què se'ls ha

eliminat el gen de la proteïna G_{ai2} , proteïna G associada als receptors vomeronasals de tipus VR1, i que per tant tenen també afectada la funció vomeronasal (Norlin et al., 2003).

Tot i que aquestes diferències entre l'efecte de lesions de l'AOB o el BOA i les delecions de gens que codifiquen proteïnes implicades en la transducció vomeronasal (TRPC2 o proteïnes G_{ai2}) semblen difícils d'explicar, Kelliher et al. (2007) han demostrat recentment que a algunes cèl·lules vomeronasals la transducció sensorial és independent del canal TRPC2. Si això és cert, les delecions dels canals TRPC2, o de proteïnes G corrent abaix en la via de senyalització, no provocarien una 'anòsmia' vomeronasal sinó un senyal feromonal parcial. Si aquest senyal feromonal és el responsable de la identificació del gènere dels conespecífics, és lògic que les esmentades delecions genòmiques desencadenen comportaments específics de gènere inadequats, en donar lloc a l'aparició de fenotips neomòrfics, com suggerien Leypold et al. (2002) per a explicar la falta d'agressivitat entre mascles TRPC2^{-/-}. Segons aquests autors, el comportament agressiu, a banda d'estar regulat per hormones, requeriria de la detecció d'una feromona que permetés el reconeixement del gènere del conespecífic i induís un comportament agressiu cap al mateix, com han demostrat recentment Chamero et al., (2007).

D'altra banda, les anormalitats comportamentals que s'observen a les femelles TRPC2^{-/-} han estat interpretades com que aquesta mutació tindria un efecte, “*masculinitzador*” sobre elles (Kimchi et al., 2007). Però les pautes motores que s'observen a les femelles TRPC2^{-/-} no són exclusives de mascles, sinó que també són pròpies de femelles en el context de la dominància o la sol·licitació (Fang i Clemens 1999; Afonso i Pfaus, 2006; Beach, 1968). Per tant es tracta de comportaments dirigits cap a mascles i cap a femelles de manera indiscriminada (Kimchi et al., 2007). Pel que fa als mascles mutants, aquests també munten altres mascles, però amb la mateixa freqüència que a les femelles. Per tant, mostren un comportament sexual indiscriminat, i no especialment dirigit cap a mascles, la qual cosa demostra que el seu cervell no està “*feminitzat*.” A més, els mateixos autors comproven que no hi ha diferències en el comportament de mascles i femelles mutants, respecte de mascles i femelles als què se'ls elimina l'OVN (Stowers et al., 2002). Per tot això, les anormalitats comportamentals observades en les femelles i els mascles TRPC2^{-/-} semblen degudes a un dèficit sensorial a l'estat adult més que a una “*masculinització*” o “*feminització*” del seu cervell, respectivament.

Per últim, cal comentar que alguns autors proposen que les alteracions a nivell del comportament que s'observen en animals amb la funció vomeronasal danyada es deuen a un dèficit

motivacional. Segons Kelliher (2007), els estímuls vomeronasals estarien implicats, exclusivament, en l'activació dels circuits que induïrien l'estat motivacional adequat per portar a terme els comportaments específics de gènere. Així, els efectes sobre el comportament que són interpretats com un dèficit sensorial que impedeix la identificació de gènere (Stowers et al., 2002; els nostres resultats), en realitat es deurien a la manca d'un estat motivacional adequat (Kelliher, 2007).

Però, si aquesta hipòtesi fora certa, implicaria l'existència d'un sistema sensorial implicat en el reconeixement de gènere (que podria ser l'olfactiu, segons apunta Kelliher, 2007), i un altre responsable de la motivació (que podria ser el vomeronasal, com també suggereix Kelliher, 2007). Aquests dos sistemes independents haurien de treballar en tàndem de manera coordinada, per garantir que el reconeixement del sexe d'un congènere a través de la olor i la motivació per a aproximar-se a ell i muntar-lo o agredir-lo (induïda pel sistema vomeronasal) ocorregueren simultàniament.

Aquesta sembla una explicació poc parsimoniosa. A nosaltres ens sembla una hipòtesi més plausible que el mateix senyal que permet la identificació del gènere (que segons els nostres resultats i tots els anteriorment exposats seria vomeronasal) provoqui la motivació adequada per portar el comportament específic de gènere adient. Per tant, certes feromones detectades pel sistema vomeronasal

informarien sobre el gènere de l'individu que les allibera al medi de manera innata. En canvi, els volàtils detectats pel sistema olfactiu principal no proporcionarien aquesta informació (almenys en la primera experiència amb ells).

Aquesta teoria ve recolzada pel fet que el nostre grup ha vist que les feromones no volàtils contingudes a la borumballa de mascle tenen propietats reforçants, ja que són capaces d'induir adquisició de preferència de lloc per la localització en què són presentades (Martínez-Ricós et al., 2007; Capítol 2 d'aquesta tesi). Per tant, sembla que els mateixos senyals que permetrien la identificació de gènere podrien reforçar el comportament d'aproximació al congènere de sexe contrari, i, fins i tot, reforçar el comportament sexual en si mateix.

1.3.3 El sistema olfactiu i l'atracció intersexual: possible paper de l'experiència

Avui en dia encara és una qüestió no resolta si els sistemes olfactiu i vomeronasal tenen funcions complementàries o redundants. Les nostres dades indiquen que les femelles de ratolí detecten senyals de mascle a través dels dos sistemes, però que mentre que les detectades a través del sistema vomeronasal són innatament atractives i responsables de la identificació del gènere dels conespecífics, les detectades pel sistema olfactiu no resulten

atractives en el primer contacte amb les mateixes (veure Experiment 2; Martínez-Ricós et al., 2007), recolzant així els resultats previs del nostre grup (Moncho-Bogani et al., 2002).

En canvi, Keller et al. (2006a) han trobat que tant les femelles amb l'OVN lesionat com les femelles amb l'OVN intacte mostren una preferència similar cap a olors (volàtils) de mascle tant quan aquests són enfrontats a senyals de mascles castrats com quan ho són a senyals de femella. Aquests resultats suggereixen que els volàtils de mascle detectats pel sistema olfatiu principal poden ser atractius per a femelles, el què contrasta amb les nostres observacions. Per contra, Pankevich et al. (2004) obtingueren resultats similars als nostres (absència de preferència intrínseca pels volàtils) en tests de preferència en els què s'enfrontaven volàtils de mascle a volàtils de femella utilitzant mascles com a subjectes experimentals. Aquestes diferències entre els nostres resultats i els de Keller et al. (2006a) poden atribuir-se a dos factors, com són el tipus de test utilitzat i l'experiència prèvia dels animals. Respecte del test utilitzat, Keller et al. (2006a; 2006b) utilitzen un test de preferència simple amb un laberint en Y, en el què un ventilador impulsava l'aire per sobre les mostres. En canvi, tant els experiments de Pankevich et al. (2004) com els del nostre grup (Moncho-Bogani et al., 2002; 2004; 2005; Martínez-Ricós et al., 2007; aquest treball) es fan utilitzant tests de preferència en els que les mostres són presentades en una caixa de

test sense cap mecanisme per a forçar la circulació d'aire a través de la font de l'estímul. Encara que en principi hom podria suposar que el laberint en Y té una major sensibilitat que el nostre test, que es més senzill, Johnston (1981) va comparar la sensibilitat de l'olfactometre (un túnel amb dos braços molt similar al laberint en Y descrit) amb els tests de preferència com el que nosaltres utilitzem, i va concloure que, al menys en hámsters, l'olfactòmetre és menys sensible per analitzar la preferència per senyals de mascle front a senyals de femella.

D'altra banda, en molts casos, la contradicció aparent entre resultats referents a l'atracció cap a volàtils podria explicar-se per diferències en l'experiència prèvia dels animals amb senyals de conespecífics del gènere contrari. Les nostres femelles són químicament verges (veure mètodes) i Pankevich et al. (2004) indiquen que les que ells utilitzen varen ser adquirides amb 5-6 setmanes d'edat (pre-pubertal). En canvi, Keller et al. (2006a; 2006b) utilitzen femelles que varen ser adquirides quan ja eren adultes (10-12 setmanes d'edat) i, encara que el contacte amb senyals derivades de mascle va ser meticulosament evitat (excepte durant els tests), l'experiència prèvia (pre- or post-pubertal) amb feromones de mascle no va ser controlada.

Hi ha evidències que suggereixen que aquesta experiència ha de tenir-se en compte. De fet, Hayashi (1985) va descriure un fenomen

d'*imprinting* cap a secrecions prepucials en femelles de ratolí que varen ser exposades a mascles adults a l'edat de 14-18 dies. Per tant, l'experiència prepubertal de les femelles amb excrecions o secrecions de mascle podria influir en la seua preferència a l'estat adult. Açò és especialment important ja que és una pràctica molt comuna en els establiments on es crien ratolins destinats a l'experimentació, el mantenir els dos pares amb les cries durant uns 10-15 dies, el que suposa que les femelles estan en contacte amb senyals de mascle adult (el seu pare), durant el període crític al qual, segons Hayashi (1985) es produiria l'*imprinting* olfactiu (Ramm et al., 2008).

Els resultats de l'experiment 2, recolzats per treballs previs del nostre grup (Moncho-Bogani et al., 2002; 2005), indiquen que l'exposició repetida de femelles adultes a borumballa de mascle indueix atracció de les femelles cap als volàtils de mascle. Els resultats de l'Experiment 2 també demostren que aquesta atracció solament s'adquireix si el sistema vomeronasal es troba intacte. En el cas contrari, els volàtils esdevenen aversius, almenys en les nostres condicions experimentals. Aquests resultats suporten la hipòtesi proposada per Moncho-Bogani et al. (2002), segons la qual durant aquestes exposicions repetides a la borumballa embrutada per mascles, té lloc una associació pavloviana entre un estímul incondicionat (les feromones masculines sexuals innatament

atractives i detectades per l'OVN) i un estímul condicionat constituït pels volàtils, probablement detectats per l'epiteli olfatiu; Figura 15).

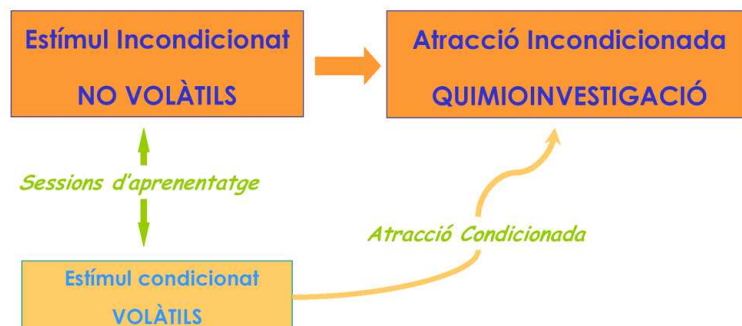


Figura 15. La borumballa embrutada per mascles intactes conté feromones no volàtils que resulten innatament atractives per a les femelles de ratolí. Així, aquestes indueixen una resposta innata (incondicionada) de quimioinvestigació. Els volàtils emanats d'aquesta borumballa resulten neutres en el primer contacte amb els mateixos, però després de l'experiència conjunta amb ells i amb els no volàtils, que són reforçants primaris (a les sessions d'aprenentatge), aquests volàtils poden convertir-se en reforçants secundaris i induir quimioinvestigació com a resposta condicionada.

Això sembla indicar que, almenys dins el context de l'atracció intersexual i el comportament sexual, les olors poden ser detectades i reconegudes (associades amb experiències passades), però solament els estímuls vomeronasals poden ser identificats sense cap experiència prèvia. És a dir, que el significat dels senyals detectats a través del sistema olfatiu s'ha d'aprendre mitjançant l'experiència,

el que permetria la seua associació amb el comportament sexual i/o amb les feromones vomeronasals

1.3.4 Estímuls olfactivus i investigació vomeronasal

Les nostres dades (Experiments 2 i 3) suporten els resultats d'estudis previs que indiquen que tant els mascles (Pankevich et al., 2004) com les femelles (Keller et al., 2006 a,b) en les que l'OVN és eliminat, són capaços de detectar i discriminar senyals de mascles dels de femelles i dels de mascles castrats, així com d'altres olors. Per tant, els senyals volàtils detectats per l'epiteli olfactivu podrien ser també importants per al comportament sexual en ratolí. En aquest sentit s'ha demostrat que les infusions de ZnSO₄ a la cavitat nasal, que resulten en una destrucció de l'epiteli olfactivu i per tant en una anòsmia temporal, tenen també un efecte dramàtic sobre el comportament de còpula tant en femelles (Edwards and Burge, 1973; Keller et al., 2006a) com en mascles (Keller et al., 2006b). D'altra banda, els animals als què els manca el gen que codifica el canal dependent de nucleòtid a2 (mutants *Cnga-/y*), que està implicat en la trasducció sensorial a l'epiteli olfactivu (però no a l'OVN) són aparentment anòsmics (Brunet et al., 1996). Els mascles mutants *Cnga-/y* no mostren ni comportament sexual dirigit cap a femelles ni comportament agressiu dirigit cap a mascles en tests estàndards (Mandiyani et al., 2005). De la mateixa manera, els mutants per

altres molècules clau en les vies de traducció olfactiva, com l'adenilat ciclasa III (ratolins AC3-/-) són, com és d'esperar gairebé anòsmics (Wong et al., 2000) i no mostren ni comportament agressiu entre mascles ni comportament sexual (Wang et al., 2006). En tots aquests animals anòsmics, ja siga per lesions de la mucosa olfactiva o degut a mutacions o a disrupcions genòmiques de la funció olfactiva, els animals mostren una quimioinvestigació molt reduïda que resulta en una disminució de la preferència cap a senyals químics del gènere contrari fins i tot quan es permet el contacte directe amb l'estímul (veure Keller et al., 2006a; 2006b). Açò recolza la proposta feta per Cowles i Phelan (1958), analitzant el comportament de les serps, segons la qual la quimioinvestigació és un procés seqüencial, en el què la detecció de volàtils per part del sistema olfactivu induiria comportaments exploratoris que inclourien els mecanismes d'introducció de les molècules a l'interior de l'OVN (Mandiyan et al., 2005), per la qual cosa es requeriria el contacte directe amb la font de l'estímul (Luo et al., 2003; Moncho-Bogani et al., 2002; 2005). La interdependència dels dos sistemes és recolzada encara més pel fet que les lesions de l'epiteli olfactivu amb sulfat de zinc que no afecten l'OVN (al menys és el què indica el marcatge dels glomèruls de l'AOB amb lectines), si que disminueix l'expressió de c-fos al BOA induïda per l'aplicació directa d'orina de mascle en la fïssura oronasal, (Martel i Baum, 2007).

A més a més, resultats recents indiquen que les proteïnes principals de l'orina (les MUPs) detectades per l'òrgan vomeronasal indueixen l'agressió entre mascles (Chamero et al, 2007). Encara que aquest fet podria contradir alguns dels resultats en els que en ratolins *knock-out* que tenen danyada la via de trasducció olfactiva mostraren una reducció en l'agressió entre mascles (Mandiyan et al., 2005; Wang et al., 2006), la possibilitat que els estímuls olfactivs afavorisquen la investigació vomeronasal seria l'explicació més plausible per a aquesta aparent contradicció. En absència d'aquestes pistes olfactivs, la investigació vomeronasal es veuria molt reduïda, de manera que la proteïna principal de l'orina que promou l'agressió no seria detectada. Un mecanisme similar explicaria perquè, malgrat que els volàtils de mascle no són intrínscament atractius (Moncho-Bogani et al., 2002; 2005) ni reforçants (Martínez-Ricós, et al., 2007; capítol següent) per a les femelles de ratolí, i l'atracció intersexual depèn fonamentalment d'estímuls vomeronasals (veure resultats), les lesions de l'epiteli olfactivu redueixen molt significativament l'atracció cap als conespecífics del gènere contrari (Keller et al., 2006 a i b), i, en conseqüència, sobre el comportament sexual (Keller et al., 2006b)

2. CAPÍTOL 2:

LES FEROMONES SEXUALS DE MASCLES SÓN REFORÇANTS PER A LES FEMELLES DE RATOLÍ.

2.1 INTRODUCCIÓ

Com s'ha explicat anteriorment, les feromones són senyals químics que s'utilitzen per a la comunicació entre individus de la mateixa espècie. Són substàncies secretades per un individu i detectades per un altre de la mateixa espècie en el què originen una reacció específica (Karlson i Luscher, 1959). Les feromones es classifiquen en dos tipus: feromones *preparadores* (*primer pheromones* en anglès), que generen respostes de caràcter fisiològic, endocrí o del desenvolupament relativament lentes, i feromones *desencadenants* (*releaser* en anglès) que desencadenen respostes comportamentals de forma immediata. Als mamífers s'han descrit diversos casos de feromones preparadores. Així, està ben documentat el retràs de la pubertat en femelles provocat per l'aglomeració amb altres femelles (Drickamer, 1977), així com l'avançament de la pubertat en femelles sexualment immadures per contacte amb feromones masculines (Vanderberg, 1969). També s'han descrit l'alentiment i sincronització dels cicles estrals entre femelles que viuen juntes en condicions de gran densitat poblacional (Lee i Boot, 1955, 1956), i els anomenats efecte Bruce (avortament induït per mascles o feromones masculines, Bruce, 1960) i Whitten (inducció de l'estre en femelles per contacte amb mascles Whitten, 1956).

Fins i tot als éssers humans, s'ha descrit l'existència de feromones contingudes a la suor de les dones, capaces d'endarrerir o frenar l'ovulació (en funció del moment del cicle de la dona receptora) provocant així l'acoblament del cicle menstrual tan comú en dones que viuen juntes (Stern i McClintock, 1998) tot i que hi ha dubtes sobre l'existència d'aquest fenomen (Wilson et al., 1991; Strassman, 1999; Yang i Schank, 2006) fins i tot en rosegadors (Schank, 2001). També s'ha observat que les persones poden discriminar el gènere d'un donant a través de la seua olor (Russell, 1976 i Wallace, 1977), i que els extractes axil·lars d'homes poden fer més regulars els cicles menstruals de les dones (Cutler et al., 1986). Fins i tot s'ha caracteritzat un component del suor dels homes (la 4,16-androstadien-3-ona) que eleva els nivells de cortisol a la saliva de les dones que l'oloren (Wyart et al., 2007).

Pel que fa a les feromones desencadenants, el cas paradigmàtic és el de les feromones sexuals als insectes. La primera feromona sexual, femenina en aquest cas, que va ser identificada, el bombikol (veure Hecker i Butenandt, 1984), es va demostrar un poderós atraient sexual per als mascles de les papallones de la seda (*Bombyx mori*). L'impacte d'una sola molècula de bombikol amb les antenes del mascle de la arna de la seda provoca canvis electrofisiològics detectables, i la col·lisió de 300 molècules en un segon desencadenen una resposta comportamental detectable en el mascle que consisteix

en una taxa de batejada d'ales altíssima, típica del festeig d'aquesta espècie (es pot trobar una amena descripció dels orígens històrics de la investigació sobre aquest tema en Schneider, 2000). En papallones voladores la resposta del mascle a la detecció de la feromona femenina és un canvi del vol en contra del vent, que aproxima el mascle a la font d'olor, la femella (veure Wyatt, 2003).

Aquest poder atractiu de les feromones sexuals als insectes ha instigat la investigació per tal d'esbrinar si als mamífers i en última instància als éssers humans, podrien trobar-se senyals químics que mitjançaren una intensa atracció intersexual. Si així fora, les feromones sexuals, ja foren olfactivess o vomeronasals, serien no sols atractives per als congèneres de l'altre sexe, sinó també reforçants.

La primera evidència que un estímul vomeronasal podia ser reforçant data de 1979, als experiments realitzats per Kubie i Halpern (1979) amb serps. A aquest treball, les serps eren entrenades en una tasca en la què havien de desplaçar-se al llarg d'un dels braços d'un laberint per obtenir aliment (extracte de cuc), que, per tant, actuava com a reforçant d'aquest comportament. El autors observaren que la disrupció del sistema vomeronasal feia que els animals deixaren de manifestar el comportament de consum d'aliment passat un cert nombre d'assajos.

Per explicar aquesta decaiguda, els autors proposaren un model de condicionament, segons el qual, l'extracte de cuc constituïa un

estímul vomeronasal amb valor reforçant. Així, després de la deaferenciació de l'òrgan vomeronasal, les serps continuarien recorrent el laberint però aquest comportament instrumental decauria degut a un procés d'extinció. A partir d'aquestes dades i analitzant-ne dades d'altres autors en altres espècies, Halpern (1987) suggerí que els estímuls vomeronasals poden ser intrínsecament reforçants.

Altres evidències que recolzen les propietats reforçants dels estímuls vomeronasals són els treballs dels anys 80 del grup de Roy Wise i d'altres grups, als quals demostraren que hom pot induir autoestimulació a través d'electrodes implantats a certes regions vomeronasals, com són l'amígdala vomeronasal (Prado-Alcalà i Wise, 1984; Kane et al., 1991) i el bulb olfactiu accessori (Phillips i Mogenson, 1968).

A més, també al voltant dels anys 80, Beauchamp i el seu equip (Beauchamp et al., 1982; 1983; 1985) feren una observació que suggeria, directament, l'existència de feromones sexuals reforçants als conills d'índies. Els seus experiments mostraven que les lesions de l'OVN en mascles de conillets d'índies, resulten en un descens en la resposta investigadora cap a l'orina de femella que aquests realitzen en condicions normals. Segons els autors, aquest descens en el temps de quimioinvestigació semblava una extinció comportamental, del que conclouien que les feromones sexuals de

femella detectades per l'OVN dels mascles podrien tenir un paper reforçant. Aquests resultats donaven suport a la idea de que els rosegadors també poden produir feromones sexuals reforçants, que sent detectades per l'òrgan vomeronasal serien els responsables de l'atracció intersexual.

Malgrat que totes aquestes evidències semblen indicar un paper reforçant dels estímuls vomeronasals, l'únic intent de demostrar aquestes suposades propietats reforçants de les feromones sexuals en rosegadors mitjançant un paradigma operant (Coppola i O'Connell, 1988) mostrà resultats no conclouents degut, molt probablement, a un disseny experimental no adequat (veure Discussió).

No obstant això, molt més recentment, Del Punta et al. (2002) també suggeriren que l'estimulació vomeronasal podria resultar reforçant basant-se en altra mena d'observacions. En aquest treball, mitjançant tècniques d'enginyeria cromosòmica, els autors provocaren una deleció del cromosoma 6 que eliminava un grup de 16 gens de receptors vomeronasals del tipus V1R. Com a conseqüència d'aquest dèficit, els mascles mutants mostraven un comportament sexual disminuït. Contràriament als animals silvestres als que el comportament sexual s'incrementava amb l'experiència sexual, a aquests mutants hi havia una disminució de la freqüència de còpula amb l'experiència. Semblava com si a aquests animals el sexe ja no

fora reforçant, el que per als autors suggereix que part del reforç de la còpula es deu, en realitat, a l'estimulació vomeronasal reforçant que ocorreria durant la còpula i el comportament paracopulatori.

Va ser en aquest context en el que el nostre grup començà el seu treball. Com hem vist, les dades de Moncho-Bogani et al. (2002) i els resultats exposats al capítol 1 indiquen que les femelles de ratolí químicament verges, mostren una clara atracció cap a borumballa embrutada per mascles. Com ja hem discutit, com que aquesta atracció no és atribuïble a l'experiència, cal pensar que es tracta d'una atracció innata o incondicionada.

Tot i això, aquesta atracció no demostra que els senyals químics continguts a la borumballa dels mascles siguin plaents, reforçants o recompensants per les femelles. Només indica una tendència innata de les femelles a explorar-les, compatible amb altres possibles explicacions. Per exemple, els mascles de gos poden explorar amb deteniment les marques d'orina d'altres mascles competidors i contramarcas-les, mostrant així 'preferència' per aquest estímul front a d'altres, sense que això indiqui que l'orina d'un mascle siga plaent per un competidor. Aquest comportament simplement pot ser indicatiu de què es tracta d'un estímul biològicament rellevant.

El fet que els volàtils puguin adquirir valor atractiu per associació amb la feromona atractiva no volàtil és una prova indirecta del valor reforçant de les feromones, però que els volàtils poden esdevenir

*Capítol 2. Les feromones sexuals de mascles són reforçants per a les femelles
de ratolí*

atractors condicionats no es demostració de què el atractor incondicionat siga reforçant. Novament, tot depèn de si hom considera (o no) que la intensa exploració de les femelles de l'orina dels mascles és indicadora del seu valor reforçant.

De fet, aquest capítol descriu els resultats de cinc experiments diferents conduents a demostrar que, efectivament, les feromones contingudes a la borumballa embrutada per mascles són reforçants per les femelles de ratolí. Perquè això siga cert assumim que la borumballa de mascle ha de ser; a) intensament explorada; b) aquesta exploració no ha de mostrar una habituació ràpida, sinó que serà persistent; c) la borumballa ha de ser capaç d'induir preferència condicionada per un lloc on l'estímul és presentat sistemàtica i reiteradament; d) aquesta preferència condicionada ha de patir extinció si l'estímul reforçant no és presentat. Per comprovar això hem dissenyat i executat els següents experiments.

A l'Experiment 1 analitzem si les femelles de ratolí exploren de la mateixa manera senyals provinents de diferents congèneres: altres femelles, mascles castrats i mascles intactes. Amb aquest objectiu realitzem un test de preferència per a cada tipus de borumballa embrutada, enfrontant-la amb borumballa neta.

A continuació, a l'Experiment 2, comparem l'exploració dels senyals procedents d'aquest tres tipus de congèneres (femelles, mascles castrats i mascles intactes), amb l'exploració d'un estímul olorós

*Capítol 2. Les feromones sexuals de mascles són reforçants per a les femelles
de ratolí*

artificial (citrálva) sense aparent rellevància biològica. A més, estudiem l'habitució front a cadascun d'aquests estímuls. Per a la qual cosa, realitzem tests de preferència similars als de l'experiment anterior, però en aquest cas es realitzen quatre tests per a cada estimul, en dies consecutius.

A l'Experiment 3 comprovem les possibles propietats reforçants de les feromones provinents de femelles, mascles castrats i mascles intactes estudiant la preferència de lloc condicionada que s'obté utilitzant borumballes d'aquests tipus de conespecífics com a premi.

Amb l' Experiment 4 estudiem la resposta d'extinció de la preferència de lloc condicionada a la presència de feromones sexuals de mascle observada a l'Experiment 3.

Finalment, a l'Experiment 5, estudiem si els senyals químics envers els quals les femelles desenvolupen preferència de lloc a l'Experiment 3 són volàtils o no volàtils.

2.2 MATERIALS, MÈTODES I RESULTATS

2.2.1 Generalitats

2.2.1.1 Tests de preferència

Tots els tests que es realitzaren en aquests experiments es feren en caixes de metacrilat (25 cm d'amplària, 50 cm de llargària i 30 cm d'alçada) amb dos recipients de vidre (6 cm de diàmetre, 5.5 cm d'alt) situats en cantons oposats de la caixa (veure Fig.3 del capítol 1). Cada recipient contenia uns 13 grams de borumballa, ja fora neta, embrutada per conespecífics o aromatitzada, segons el grup i l'experiment.

Prèviament a la realització de cadascun dels experiments, els animals eren habituats tant a la caixa de test com a l'experimentador, amb l'objectiu de disminuir el possible estrès que aquesta manipulació poguera originar en els animals. Aquesta habituació consistia en què, durant els 3 o 4 dies previs a cada experiment, els animals eren dipositats a la caixa de test durant 10-15 minuts cada dia.

Després de l'habitució, en tots els experiments es realitzà un test control per analitzar si els animals presentaven una preferència prèvia per algun dels dos costats de la caixa. L'objectiu d'aquest test era descartar un possible esbiaix dels animals per un dels costats de

la caixa. De fet, els animals que en aquest test passaven explorant un dels recipients més del doble de temps que l'altre, eren eliminats (n=10).

Tots els tests realitzats en el conjunt dels 5 experiments que conformen aquest capítol varen ser gravats en vídeo i, posteriorment, un observador que desconeixia les condicions experimentals en què s'havia realitzat cadascun d'ells (tipus de borumballa, experiència previa de l'animal o grup al que pertanyia), mesurà el comportament exploratori dels animals durant els primers 5 minuts. Als Experiments 1 i 2, en els què s'analitzava el comportament de quimioinvestigació de les femelles sobre estímuls provinents de diferent tipus de conespecífics, es mesurà el temps que els animals passaven clarament explorant la borumballa de cadascun dels dos pots escarbant-la o olorant-la a menys d'1 cm de distància del pot. En canvi, als Experiments 3, 4 i 5, en els què s'analitzava preferència de lloc, es mesurà el temps que els animals passaven a cadascun dels pots (incloent-hi un àrea d'1 cm al voltant dels mateixos), independentment del comportament que hi estigueren realitzant.

2.2.1.2 Animals

Per als experiments d'aquest capítol es feren servir 142 femelles adultes (de més de 9 setmanes d'edat) de la soca CD-1, i que foren

criades sense contacte amb cap senyal químic no volàtil procedent de mascles adults (femelles químicament verges; veure Capítol 1).

Tots els experiments varen ser realitzats d'acord amb les pautes del Consell de Comunitats Europees (86/609/EEC) per a l'ús d'animals experimentals. Els procediments van ser aprovats pel Comitè d'Ètica per a l'Experimentació animal de la Universitat de València.

2.2.1.3 Estímuls

Com a font d'estímuls químics procedents de conespecífics es va fer servir borumballa embrutada per congèneres o aromatitzada. La borumballa embrutada per mascles castrats i per femelles era recollida de caixes d'estabular en les què hi havia hagut entre 3 i 6 animals durant un període de temps de quatre dies. Per assegurar que la borumballa d'un determinat tipus de conespecífic era homogènia al llarg de tot l'experiment, es recollia borumballa de diferents gàbies, es mesclava i es congelava a -20° fins el dia del test. En el cas de la borumballa embrutada per mascles es seguia el protocol explicat al capítol anterior. Per a obtenir borumballa de mascle castrat, tres mascles adults van ser orquidectomitzats sota anestèsia (pentobarbital, 55mg/Kg de pes, injecció intraperitoneal). Una vegada que ja es trobaven completament recuperats els animals (un mes després de la cirurgia) la borumballa es començava a recollir seguint el protocol explicat.

2.2.1.4 Anàlisi de dades

Per a tots els experiments, la primera cosa que es va comprovar va ser si les dades seguien una distribució normal, mitjançant un test de Kolmogorov-Smirnov (i aplicant la correcció de Lillieford). D'altra banda, per a analitzar si els animals exploraven un costat de la caixa més que l'altre al test control, el temps explorant cadascun dels 2 pots en aquest test es va comparar mitjançant una *t* d'Student per a mostres emparellades. Per a analitzar les dades dels tests de preferència es va utilitzar una ANOVA de mesures repetides. En aquesta ANOVA, quan l'esfericitat no podia ser assumida (segons el test de Mauchy) es va aplicar la correcció de Greenhouse-Geisser. En els casos en què era apropiat, a continuació de l'ANOVA es van analitzar els efectes principals dels factors i les seues interaccions mitjançant comparacions per parelles post-hoc amb la correcció de Bonferroni. L'efecte de la localització (dreta o esquerra) de la borumballa estímul sobre els tests va ser analitzat mitjançant una *t* d'Student per a mostres independents (als Experiments 2 i 3) o amb ANOVA d'una via (a l'Experiment 4, en el què cada subgrup tenia un número diferent d'animals). Totes les anàlisis es van fer utilitzant l'SPSS 12.0.1.

2.2.2 Experiment 1: Anàlisi de l'atracció cap a senyals de diferents conespecífics en femelles de ratolí

L'objectiu d'aquest experiment era analitzar l'atracció que experimenten les femelles de ratolí cap a senyals químics provinents de diferents tipus de conespecífics (altres femelles, mascles castrats i mascles intactes). Amb aquest objectiu, les femelles varen ser exposades a una sèrie de tests de preferència en els què tenien accés a borumballa d'un dels tipus de conespecífics i borumballa neta simultàniament.

2.2.2.1 Protocol

En aquest experiment es feren servir 15 femelles químicament verges. Després de l'habitució, i del test control (en el qual hi havia borumballa neta en els dos pots, test N/N) les femelles van ser exposades a 3 tests de preferència en cadascun dels quals tenien accés a borumballa d'un tipus de conespecífic (altres femelles, mascles castrats o mascles intactes) en un pot i a borumballa neta en l'altre. Així, analitzarem la quimioinvestigació de senyals de femelles adultes (borumballa neta vs. borumballa de femella, test N/F), de senyals de mascle castrat (borumballa neta vs. borumballa

de mascle castrat, test N/MC) i senyals provinents de mascle intacte (en un test borumballa neta vs. borumballa de mascle, test N/M).

Aquests tests es van realitzar de manera consecutiva i separats entre ells per 30 minuts. En tots els casos, la borumballa estimul es va situar al pot esquerre de la caixa, mentre que el dret contenia borumballa neta.

2.2.2.2 Resultats

La *t* d'Student comparant el temps que els animals exploraven el dos pots al test control va mostrar que l'exploració de la caixa era equilibrada (Student's *t* test, $t = -1.52$, $p=0.15$). Una ANOVA per a mesures repetides amb TEST (N/N, N/F, N/Mc, N/M) com a factor *intra-subjectes* mostrà que l'exploració del pot situat a la dreta de la caixa, que contenia la borumballa embrutada per cada tipus de conespecífic als test de quimioinvestigació (N/F, N/Mc, N/M) i borumballa neta al test control (N/N) depèn significativament del factor TEST ($F=4,419$, $p=0.036$). Les comparacions per parelles posteriors, indicaren que el temps al pot dret al test control difereix del temps passat en aquest pot als altres tests (N/F: $p=0.013$, N/Mc: $p=0.024$ i N/M: $p=0.006$). En canvi, no es trobaren diferències entre l'exploració de la borumballa procedent de les tres diferents classes de conespecífics entre si. ($p>0.1$ en tots els casos; Figura 16).

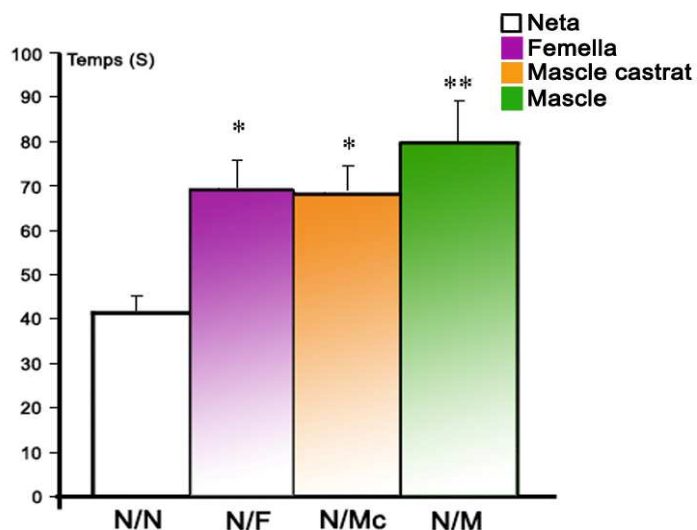


Figura 16. Histograma de barres del temps de quimioinvestigació (mitjana \pm SEM) que mostren les femelles de l'Experiment 1 cap a la borumballa neta (barra blanca) i cap a la borumballa embrutada per altres femelles, mascles castrats i mascles intactes (barres morada, taronja i verda, respectivament). Les anàlisis estadístiques (veure el text) mostren una clara diferència entre l'exploració de la borumballa neta i les embrutades per conespecífics, però no indiquen diferències entre l'exploració de les borumballes embrutades pels diferents conespecífics (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.001$).

Per tant, en les condicions en què aquest test es va realitzar, les femelles exploren amb la mateixa intensitat les senyals provinents dels tres tipus de conespecífics independentment de quin siga el gènere i l'estat hormonal dels mateixos.

2.2.3 Experiment 2: Dinàmica de la quimioinvestigació d'olors neutres i d'olors provinents de conespecífics.

A continuació, i degut a que l'Experiment 1 donà resultats inconclusius, a l'Experiment 2 analitzàrem de nou la resposta quimioinvestigadora cap a la borumballa embrutada per femelles, mascles castrats i mascles intactes en tests de preferència, però amb un disseny experimental un tant diferent. En aquest experiment la quimioinvestigació cap a senyals d'aquests tres tipus de conespecífics va ser analitzada en tres grups independents, i, a més, repetirem els tests de preferència fins a un total de 4 vegades, de manera que poguérem analitzar la dinàmica de la resposta quimioinvestigadora front a cadascun d'aquests estímuls (habitució, sensibilització o estabilitat). D'altra banda, en un quart grup, les femelles van ser exposades també a 4 tests de preferència però en aquest se'ls presentà una substància olorosa artificial, la qual cosa ens permeté comparar la dinàmica de quimioinvestigació d'estímuls de congèneres amb la de l'exploració d'una olor sintètica neutra.

2.2.3.1 Protocol

Després de l'habitució, els animals van ser assignats aleatòriament a un dels 4 grups, que varen ser exposats a tests de preferència per

diversos estímuls consistents en borumballa embrutada per femelles d'altres gàbies (n=9), per mascles (n=10), o per mascles castrats (n=10) i a borumballa odorisada amb citralva (geranonitrile, 3,7-dimethyl-2,6-octadiene-1-nitrile, proporcionada per International Flavours and Fragrances, Barcelona, Spain; 2 µl in 20 g de boromballa neta; n=10), respectivament. Els dies següents al test control (Dia 0, borumballa neta als dos pots, test control) els animals van ser exposats a 4 tests de preferència (un test de preferència per dia, Dies 1-4) en els què en un dels recipients hi havia borumballa neta i en l'altre la borumballa estímulo corresponent, segons el grup. El pot que contenia la borumballa estímulo era canviat de posició a la caixa (dreta o esquerra) cada dia de test per evitar qualsevol associació entre estímulo i posició.

2.2.3.2 Resultats

En tots els grups, el test de *t* Student va mostrar que no hi havia cap diferència en el temps que els animals exploraven el costat dret o esquerre al test control ($p > 0.2$ en tots els grups). Una vegada aclarit això, les dades varen ser analitzades amb una ANOVA de mesures repetides comparant l'exploració de la borumballa (embrutada per conespecífics o odorisada) amb GRUP (Citalva, Mascle Castrat, Femella i Mascle) com a factor *entre-subjectes* i TEST (Dies 1-4) com a factor *intra-subjecte*. Aquesta ANOVA revelà una interacció

*Capítol 2. Les feromones sexuals de mascles són reforçants per a les femelles
de ratolí*

significativa entre els factors GRUP i TEST ($F_{12, 140} = 3.393$, $p < 0.001$). Per tant, els grups mostraven diferents patrons d'investigació al llarg dels 4 dies d'experiment.

Les comparacions per parelles mostren que el temps que els animals passen explorant la citralva durant els tests de preferència dels dies 1-4 no era significativament diferent del temps que passaven investigant el mateix pot en la situació control ($p > 0.05$ en tots els casos; Figura 17A), mentre que la investigació de la borumballa de mascle castrat diferia de la de borumballa neta en el dia control, però sols en el primer dels tests (Dia 1, < 0.001 ; Figura 17B). L'exploració de la borumballa embrutada per femelles (Figura 17C) era intensa durant els dies 1 i 2 ($p < 0.001$ en ambdós casos), però dequeia fins als nivells d'exploració del dia control els tests dels dies 3 i 4 ($p > 0.05$ per als dies 3 i 4). Finalment, el temps que les femelles passaven investigant la borumballa embrutada per mascles (Figura 17D) es va mostrar significativament superior al temps investigant la borumballa neta durant tot l'experiment ($p < 0.05$ per a tots els tests).

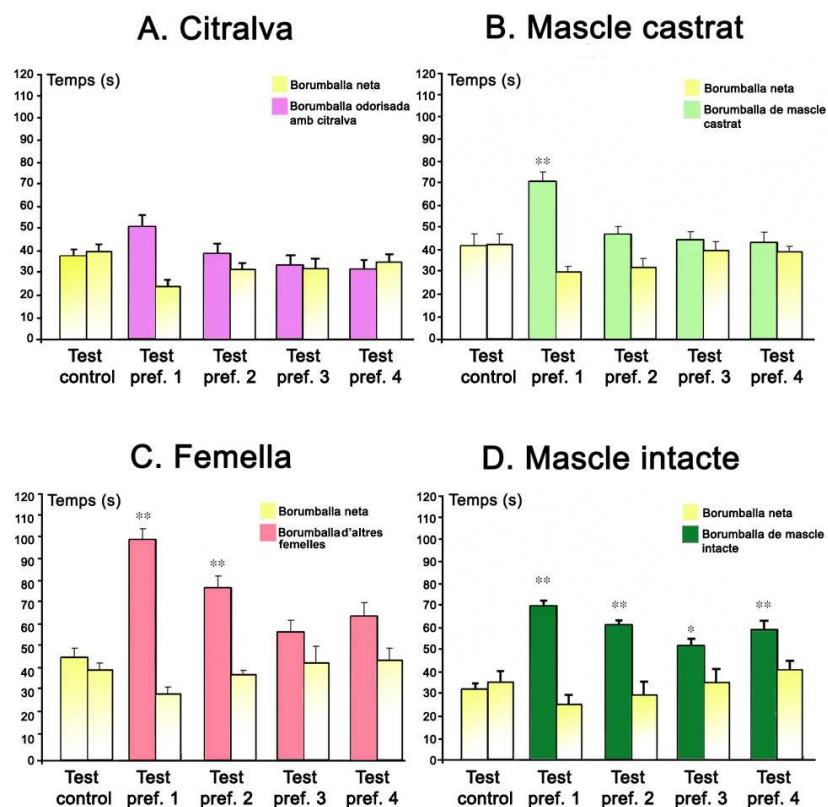


Figura 17. Histograma de barres del temps de quimioinvestigació (mitjana \pm SEM) que mostren les femelles de l'experiment 2 cap a la borumballa odorisada amb citralva (A) o embrutada per mascles castrats (B), per altres femelles (C) i per mascles intactes (D). Per a explicació veure text, (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.001$).

En resum, les femelles no exploren significativament més la borumballa odorisada amb citralva que la borumballa neta, i sí la provinent de congèneres, encara que mostren diferents dinàmiques d'exploració cap a borumballa procedent de diferents conespecífics. De tal manera que la borumballa embrutada per mascles castrats i

per femelles va ser explorada de manera transitòria (encara que l'exploració de la borumballa embrutada per femelles era més persistent), mentre que l'exploració de la borumballa embrutada per mascles no mostra evidències d'habitució al llarg de l'experiment.

2.2.4 Experiment 3: Anàlisi de les propietats reforçants de les feromones atractives

Per a analitzar les possibles propietats reforçants de senyals químics procedents de diferents tipus de conespecífics, testàrem si eren capaces d'induir en les femelles adquisició de preferència pel lloc en el què es presentaven de manera sistemàtica (adquisició de preferència de lloc o *place preference*), per mitjà d'un paradigma de *place-conditioning* adaptat de Crowder i Hutto (1992).

2.2.4.1 El test de preferència condicionada de lloc

El paradigma de preferència condicionada de lloc és un dels més utilitzats per demostrar el valor reforçant d'estímuls naturals o de drogues (Tzschentke, 1998). En aquests experiments es sol gastar una caixa de test semblant a la de la Figura 18.

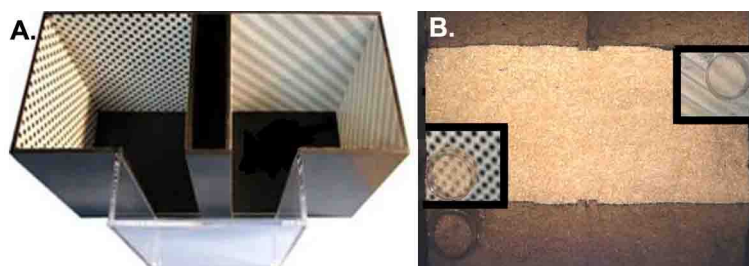


Figura 18. A) Caixa de *place preference* utilitzada en la major part dels estudis. Com es pot observar, hi ha dos compartiments de característiques físiques distintes (un amb ratlles i l'altre amb punts) per tal que l'animal els reconega com a distintes. Un dels dos serà el reforçat (l'animal hi trobarà la recompensa) i l'altre el no reforçat (l'animal no hi trobarà cap recompensa). Al llarg de les sessions d'aprenentatge, l'experimentador dona el suposat estímul reforçant a l'animal i, immediatament després, el diposita al compartiment reforçat. Al final d'aquestes sessions es mesura la preferència adquirida pel compartiment que ha estat recompensant, mesurant si l'animal passa més temps en aquest compartiment en absència de cap recompensa. B) Caixa de *place preference* que utilitzem als nostres experiments. En aquesta, no reforçem tot un compartiment, sinó un dels recipients situats a un dels cantons, dipositant en ell la borumballa embrutada per mascles intactes. L'altre pot no es reforçat perquè el que conté és borumballa neta o de mascle castrat segons l'experiment. A la imatge hem tractat de reflexar l'equivalència entre dues caixes, marcant amb la mateixa trama de ratlles i punts les àrees reforçades i no reforçades a cadascuna d'elles.

Com es pot observar, la caixa té un compartiment menut neutre, que dona entrada a dos compartiments majors de característiques físiques diferents (per exemple, un amb ratlles i l'altre amb punts com a la Figura 18A) per tal que l'animal els reconega com a distintes. Un dels dos serà el reforçat (l'animal hi trobarà la recompensa) i l'altre el no reforçat (l'animal no hi trobarà cap recompensa). Al llarg

de les sessions d'aprenentatge, l'experimentador dona a l'animal l'estímul suposadament reforçant i, immediatament després, el diposita al compartiment reforçat. Al final d'aquestes sessions es mesura la preferència adquirida pel compartiment que ha estat recompensat, mesurant si l'animal passa més temps en aquest compartiment que en l'altre en absència de cap recompensa.

El nostre test de preferència de lloc és molt diferent del clàssic i es fa en caixes semblants a les dels experiments anteriors, com la que es mostra a la Figura 18B. Durant les sessions d'aprenentatge, els animals són dipositats al centre de la caixa de test on poden explorar lliurement tota la caixa i els dos pots que hi ha dipositats al seu interior. Per tal d'obtenir el reforç els animals han d'explorar de manera activa el recipient que conté la borumballa estímul. Un dels pots conté la borumballa suposadament recompensant, mentre que l'altre conté borumballa neta, previsiblement no recompensant. Els espais reforçat i no reforçat són les àrees pròximes als dos pots i l'animal fa servir referències espacials externes a la caixa (fites rellevants de l'habitació on es duu a terme el test) per tal d'orientar-se i reconèixer cadascuna de les parts de la caixa de test.

En funció de les propietats reforçants dels estímuls (borumballa) que es presenten en els pots, l'animal adquirirà preferència per situar-se en l'àrea reforçada, de manera que mesurarem una permanència major en aquesta part que en la resta de la caixa o en les rodalies de

l'altre pot. Pel contrari, si cap dels estímuls als què té accés l'animal té propietats reforçants no trobarem diferències en el temps que l'animal passa a les dues àrees que envolten els pots.

2.2.4.2 Disseny experimental

En aquest experiment, tres grups d'animals (n=10 per grup) van ser exposats a borumballa de femella (grup Femella), borumballa embrutada per mascles castrats (grup Mascle Castrat) i borumballa de mascle (grup Mascle), respectivament. Després de l'habitució i del test control (borumballa neta als dos recipients, Dia 0), els animals van ser exposats a 4 *sessions d'aprenentatge* (Dies 1-4, una sessió de 10 minuts per dia) en les què la borumballa embrutada per conespecífics (femella, mascle castrat o mascle intacte segons el grup) era sistemàticament col·locada al mateix pot de la caixa. Amb la intenció d'eliminar un possible efecte del costat en què es presenta la borumballa estimul sobre l'exploració que les femelles porten a terme sobre la mateixa, a la meitat dels animals de cada grup se'ls presentava la borumballa estimul al pot de costat esquerre durant totes les *sessions d'aprenentatge* (n=5 per grup) i a l'altra meitat al pot del costat dret (n=5 per grup). L'altre pot contenia borumballa neta en tots els casos. El comportament del animals durant els primers 5 minuts del test control i de tots els tests preferència era gravat. El dia 5, analitzàrem si les femelles havien adquirit

preferència pel pot en el què la borumballa embrutada per conespecífics havia estat col·locada durant els dies 1-4. Per a la qual cosa es va realitzar un test en el que hi havia borumballa neta en ambdós recipients (test de preferència de lloc, Dia 5). Les dades del control, tres de les sessions d'aprenentatge i del test de preferència de lloc es van analitzar.

2.2.4.2 Resultats

Les femelles dels tres grups mostraren un comportament d'exploració equilibrat de tota la caixa en el test control ($p > 0.4$ en tots els casos). En cada grup, cada subgrup en el què la borumballa va ser presentada a la dreta o l'esquerra mostraren una exploració equivalent ($p > 0.1$ en tots els casos). Per tant, les dades dels dos subgrups varen ser agrupades per a les anàlisis posteriors.

Les dades varen ser analitzades mitjançant una ANOVA de mesures repetides amb TEST (control, 2n, 3r i 4rta sessió d'aprenentatge i test de preferència de lloc) com a factor *entre-subjectes* i GRUP (Femella, Mascle Castrat i Mascle) com a factor *intra-subjectes*. Les dades de la primera de les sessions d'aprenentatge no varen considerar-se per a l'anàlisi per tal d'evitar la influència d'un possible efecte novetat. Els resultats de l'ANOVA mostraren una interacció significativa entre TEST i GROUP ($F_{8,108} = 2.564$, $p = 0.013$), un

efecte significatiu del factor TEST ($F_{4,108} = 12.877$, $p < 0.001$), i un efecte quasi significatiu del factor GRUP ($F_{2,27} = 3.243$, $p = 0.055$).

Les comparacions per parelles al grup Mascle Castrat mostraren que no hi havia diferències entre l'exploració de la borumballa de mascle castrat i la neta en cap dels dies analitzats, ni en les *sessions d'aprenentatge* ni en el test de preferència de lloc ($p > 0.15$ en totes les comparacions; Figura 19A). Les dades del grup Femella revelaren que les femelles exploren significativament més la borumballa embrutada per altres femelles (en comparació amb l'exploració del mateix recipient el dia del control) durant totes les *sessions d'aprenentatge* ($p < 0.002$ en totes les comparacions), però en canvi no mostraren preferència de lloc ($p > 0.9$; Figura 19B)

Finalment, en el grup "Mascle" (Figura 19C) totes les *sessions d'aprenentatge* diferien del control ($p < 0.05$). I, el que és més important, el comportament durant el test de preferència de lloc, va ser també diferent del test control ($p < 0.01$) i similar al de les *sessions d'aprenentatge* ($p > 0.9$ en tots els casos). Per tant, durant els dies en què van ser exposades a la borumballa de mascle (*sessions d'aprenentatge*), les femelles van associar les senyals provinents de mascle amb la part de la caixa en què eren presentades, i van desenvolupar preferència per aquesta localització. Així, durant el test de preferència de lloc, aquesta preferència és expressada fins i tot en absència de l'estímul.

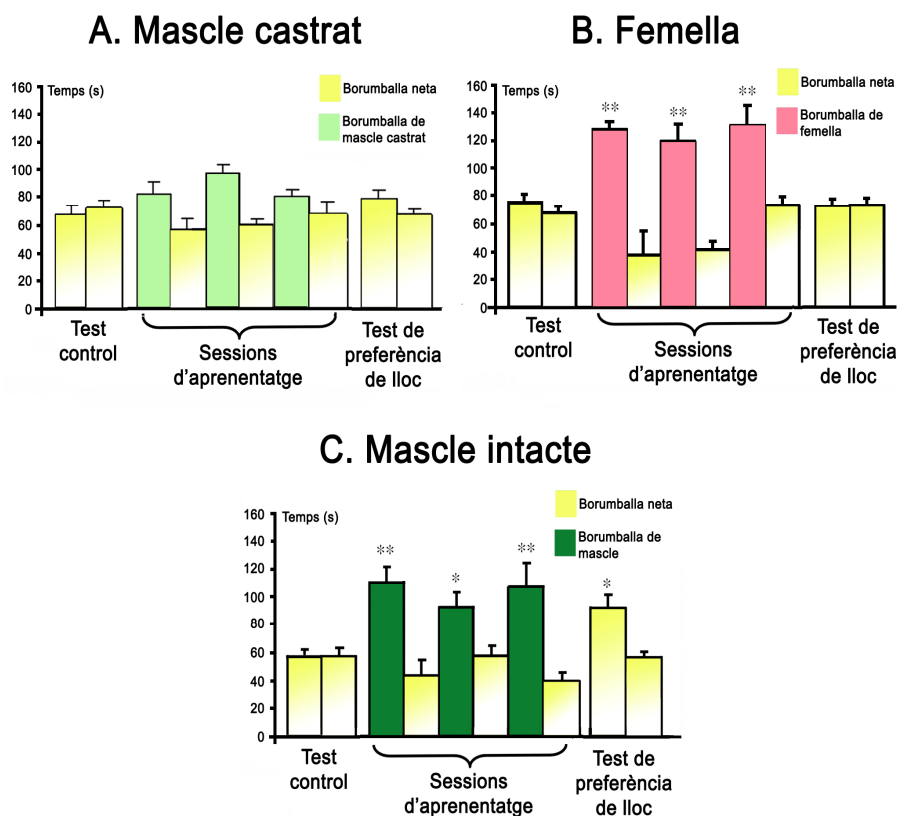


Figura 19. Histogrames de barres del temps (mitjana \pm SEM) que les femelles estan sobre el pot que conté borumballa neta o embrutada durant les diferents sessions de l'experiment 3. L'histograma A mostra el resultat del grup exposat a borumballa embrutada per mascles castrats durant les sessions d'aprenentatge, mentre que els altres histogrames il·lustren els resultats dels grups exposats a estímuls derivats de femella (B) i de mascles intactes (C). Les anàlisis estadístiques mostren que solament els senyals continguts en la borumballa embrutada per mascles indueixen adquisició de preferència de lloc (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.001$).

2.2.5 Experiment 4: Dinàmica de la preferència de lloc induïda per feromones

2.2.5.1 Protocol

Una vegada comprovat que la borumballa embrutada per mascles intactes conté certs senyals que tenen propietats reforçants per a les femelles de ratolí, ens plantejarem estudiar quina permanència té en el temps l'adquisició de preferència de lloc que aquestes indueixen. Per a la qual cosa analitzarem el procés d'extinció del comportament de preferència de lloc condicionada. El protocol en aquest cas va ser similar al de l'Experiment 3, però després del test de preferència de lloc, els animals (n=16), varen ser exposats a 3 tests més en els que els dos recipients contenien borumballa neta (N/N1, N/N2 i N/N3; dies 8, 11 i 14). De la mateixa manera que a l'Experiment 3, a la meitat dels animals se'ls va presentar la borumballa de mascle al pot de la part esquerra de la caixa i a l'altra meitat al de la dreta. Les dades del control, del test de preferència de lloc i dels tres tests N/N posteriors varen ser analitzades.

2.2.5.2 Resultats

Les dades del test control revelaren que les femelles no preferien cap dels costats ($t = 1.702$; $p = 0.109$). A més, el temps que passaven explorant la borumballa de mascle era equivalent quan aquesta era

presentada a la dreta o a l'esquerra de la caixa (*t* d'Student, dades de totes les sessions d'aprenentatge agrupades; $t = 1.58$, $p = 0.12$). Per tant, les dades dels dos subgrups varen ser agrupades per a les següents anàlisis.

Per a analitzar les dades es va fer servir una ANOVA de mesures repetides amb TEST (control, test de preferència de lloc i tres N/N tests) com a factor *intra-subjectes*, que va revelar un efecte del factor TEST ($F_{4,60} = 11.037$, $p = 0.001$). Les comparacions per parelles posteriors indicaren que les femelles adquireixen una preferència de lloc (dia 5 difereix del control; $p = 0.027$), que ràpidament desapareix (cap altre dia difereix del control, $p > 0.05$ en tots els casos; Figura 20).

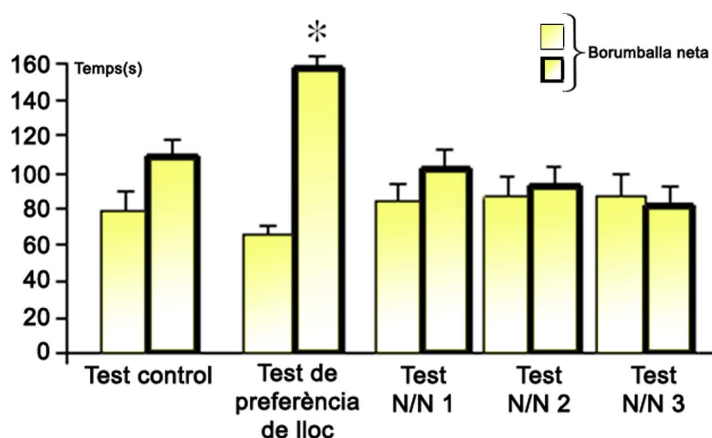


Figura 20. Histograma de barres que representa el temps (mitjana \pm SEM) que les femelles estan sobre els dos pots durant els test control i els successius tests de preferència de lloc a l'experiment 4. El pot que ha contingut borumballa de mascles intactes durant les sessions d'aprenentatge ve indicat per barres amb línia grossa. Per a explicació veure text (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.001$).

Açò indica que, en absència de l'estímul reforçant (la borumballa embrutada per mascles), la preferència apresada decau ràpidament.

2.2.6 Experiment 5: Anàlisi de la volatilitat de les senyals químiques reforçants de mascle.

En aquest experiment estudiarem si els senyals reforçants continguts a la borumballa de mascle són volàtils o no volàtils. A més, com que es va fer servir borumballa de mascle castrat com a estímul control, aquest experiment ens permeté comprovar si el senyal contingut a la borumballa embrutada per mascles és dependent de testosterona (com ja suggereixen els experiments 2 i 3).

2.2.6.1 Protocol

Els animals van ser assignats aleatòriament a dos grups. En el primer grup (Volàtils i No Volàtils, V+NV, n=7), els animals podien contactar amb la borumballa, de manera que tenien accés tant als senyals volàtils com als no volàtils continguts en la mateixa. Als tests que es realitzaren amb els animals de l'altre grup ('Volàtils', V, n=9), es va col·locar a la caixa una plataforma perforada que prevenia el contacte directe amb la borumballa. Per tant, els animals d'aquest grup tenien accés solament als volàtils que emanaven d'aquesta.

El protocol que es va desenvolupar en aquest experiment va ser molt similar al portat a terme a l'Experiment 3. Així, després de

l'habitació (amb mascle castrat en els dos pots) les femelles varen ser testades en la situació control (mascle castrat en els dos recipients, Dia 0, test control) i després varen ser exposades a 4 sessions d'aprenentatge (Dies 1-4, una sessió per dia), en les què la borumballa embrutada per mascles intactes era col·locada sistemàticament en un dels pots mentre que l'altre sempre contenia borumballa de mascle castrat. Igual que als experiments anteriors de preferència de lloc, en cada grup el número d'animals en què la borumballa de mascle intacte era presentada al pot de la dreta i el número d'animals en què era presentat a l'esquerra estava equilibrat. Finalment, el dia 5 testàrem si les femelles havien adquirit preferència de lloc pel pot en què la borumballa de mascle intacte havia estat presentada durant les sessions d'aprenentatge, mitjançant un test amb borumballa de mascle castrat als dos pots (test de preferència de lloc). Les dades del control, de les tres últimes sessions d'aprenentatge (la primera no va ser inclosa perquè durant aquesta el temps d'exploració pot veure's influenciat per l'efecte novetat) i del test de preferència de lloc van ser analitzades.

2.2.6.2 Resultats

En el test control, tant les femelles del grup Volàtils (V) com les del grup No-volàtils (V+NV) mostraren un comportament exploratori de la caixa equilibrat ($p > 0.2$ en tots els casos). En els dos grups, el

temps explorant els senyals químics derivats de mascle no variava quan aquestes eren presentades en la part dreta o en la part esquerra de la caixa (ANOVA d'una via, dades de totes les sessions d'aprenentatge agrupades; en els dos grups $F < 1$, $p > 0.5$). Per tant, les dades dels dos subgrups varen ser agrupades per a les següents anàlisis.

La dinàmica de quimioinvestigació dels senyals químics (tant volàtils com no volàtils) derivats de la borumballa embrutada per mascles front a l'embrutada per mascles castrats va ser estudiada mitjançant una ANOVA de mesures repetides amb TEST (control i 1^a, 2^a, 3^a and 4^{ta} sessions d'aprenentatge) i ESTÍMUL (mascle castrat i mascle intacte) com factors *intra-subjectes*, i GRUP (V+NV i V) como a factor *entre-subjectes*. Aquesta anàlisi revelà una interacció significativa entre GRUP i ESTÍMUL ($F_{4,11}=9.202$, $p=0.009$), així com un efecte significatiu dels factors ESTÍMUL ($F_{1,14} = 10.82$, $p =0.005$), TEST ($F_{4,11}=3.837$, $p=0.008$) i GRUP ($F_{1,14}=11.232$, $p=0.005$). La resta dels resultats de l'ANOVA no varen ser significatius (p -valor > 0.1).

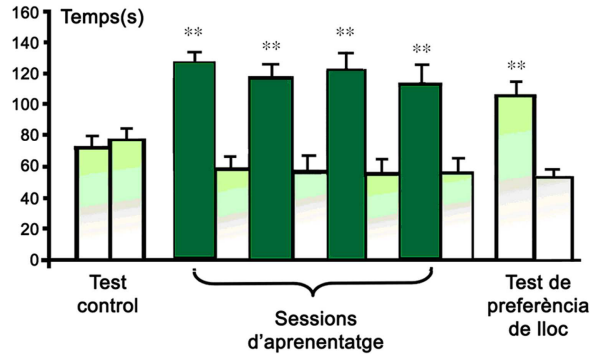
La interacció entre GRUP i ESTÍMUL indica que els animals dels dos grups prefereixen de manera diferent un del estímuls. Les comparacions per parelles mostraren que els animals del grup V+NV prefereixen la borumballa de mascle intacte front a la de mascle castrat (Figura 21A; $p<0.001$; asteriscos dobles en Fig. 17A) mentre que els animals del grup V no (Figura 21B; $p=0.867$). De manera

consistent amb aquests resultats, l'anàlisi dels efectes simples mostrarà un efecte significatiu del factor TEST sobre el comportament exploratori dels animals del grup V+NV ($p=0.004$), però cap efecte ($p=0.315$) al grup V. En altres paraules, quan el contacte amb la borumballa es permès, de manera que els animals poden detectar els senyals tant volàtils com no volàtils continguts en ella, les femelles prefereixen la borumballa embrutada per mascles intactes front a la de mascles castrats. En canvi, si l'accés als no volàtils s'evita, les femelles no mostren preferència per cap dels dos estímuls. Com que en aquesta situació les femelles són capaces de detectar els volàtils derivats de la borumballa, es pot concloure que el senyal contingut a la borumballa de mascles que és innatament atractiu per a les femelles és de naturalesa no volàtil i dependent de testosterona. A més, és de destacar que la dinàmica d'aquesta atracció en el grup V+NV indica que no hi ha habituació al llarg dels tests consecutius. D'altra banda, l'exposició repetida a volàtils en el grup V tampoc no canvia el comportament exploratori dels animals.

Per últim, la inducció de preferència de lloc per part dels senyals volàtils o no volàtils va ser analitzada mitjançant una ANOVA de mesures repetides amb el factor TEST (control i test de preferència de lloc) i ESTÍMUL (mascle castrat i mascle intacte) com a factors *intra*-subjectes i factor GRUP (V i V+NV) com a factor *entre*-subjectes. Aquesta anàlisi revelà que la interacció de tercer ordre TEST x GRUP

x ESTÍMUL era significativa ($F_{1,14}=5.714$, $p=0.031$), així com les interaccions dobles GRUP x ESTÍMUL ($F_{1,14} = 7.904$, $p = 0.014$) i

A. Volàtils + No volàtils



B. Volàtils

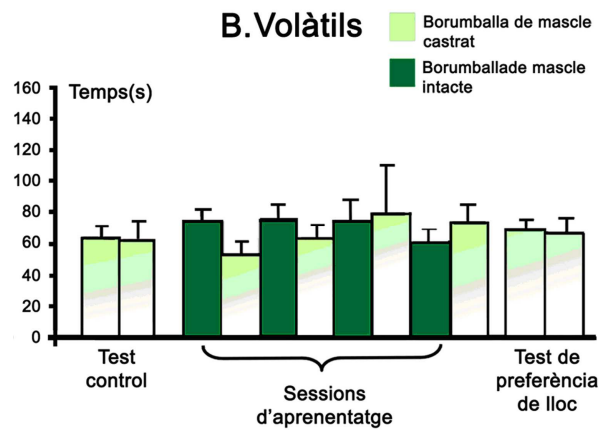


Figura 21. Histograma de barres del temps (mitjana \pm SEM) que les femelles dels grup V+NV (A) i V (B) estan sobre el pot que conté borumballa embrutada per mascles castrats (barres verd clar) durant tot l'experiment, i sobre el pot que conté borumballa embrutada per mascles intactes (barres verd fosc;A). Les anàlisis estadístiques mostren que solament al grup A, és a dir, quan els animals poden detectar els senyals no volàtils continguts a la borumballa embrutada per mascles adquireixen preferència de lloc (*, $p<0.05$; **, $p<0.001$).

*Capítol 2. Les feromones sexuals de mascles són reforçants per a les femelles
de ratolí*

TEST x ESTÍMUL ($F_{1,14}=0.021$, $p=0.021$) i el factor ESTÍMUL ($F_{1,14}=7.582$, $p=0.016$). La resta de resultats de l'ANOVA no van ser significatius.

Com pot ser observat a la Figura 21, i és confirmat per les comparacions per parelles, els animals del grup V+NV adquiriren preferència condicionada de lloc (control vs. test de preferència de lloc, $p<0.001$; asterisc doble en la Figura 21) però no els animals del grup V.

En conclusió, aquest experiment indica que els senyals continguts en la borumballa de mascles que indueixen una intensa quimioinvestigació així com l'adquisició de preferència per la localització en que són presentades, es produeixen de forma dependent de testosterona. També indica que aquests senyals són no volàtils o inclouen components crítics no volàtils.

Per tant, la borumballa de mascle conté certa/es senyal/s químics dependents de testosterona i de naturalesa no volàtil que són reforçants per a femelles de ratolí.

2.3 DISCUSSIÓ

2.3.1 Consideracions metodològiques

A aquest capítol realitzem una sèrie del què anomenem tests de preferència entre dos estímuls o d'elecció simple (*two-choice tests*). En ells els animals poden explorar lliurement una caixa a la què tenen accés simultàniament a dos estímuls distints (borumballa neta embrutada per diferents tipus de congèneres o odoritzada segons l'experiment i el test), que són col·locats en dos pots situats a costats oposats de la caixa. Per tant, els animals poden elegir entre explorar un estímuls o un altre. Això ens permet valorar l'atracció que exerceixen aquests estímuls sobre les femelles de ratolí per simple comparació del temps que aquestes investiguen cadascun d'ells.

Malgrat que a priori, i donada la seua simplicitat, aquest sembla un bon disseny, els tests d'elecció simple presenten algunes limitacions que cal comentar.

2.3.1.1 Efecte novetat

La primer limitació que presenta el disseny dels nostres tests d'elecció simple és que els resultats que observem poden veure's influenciats pel què es coneix com *efecte novetat*. Com hem dit anteriorment, els ratolins són animals quimiosensorials, i basen el

seu coneixement del medi en la quimioexploració de l'entorn, tant per obtenir informació relativa a la comunicació intraespecífica, com pel que té a veure amb la orientació espacial, la detecció de depredadors, fonts d'aliment, etc.. Per això, quan són introduïts a un ambient nou, com és la caixa de test, el seu comportament natural és investigar tota la caixa usant fonamentalment els sistemes quimiosensorials (quimioinvestigació) i les vibrisses. Als nostres experiments, el pot que conté la borumballa embrutada per conespecífics constitueix un estímul olorós amb el que pot ser les femelles no han estat en contacte prèviament, mentre la resta de la caixa i l'altre pot contenen borumballa neta, amb la que les femelles estan familiaritzades. Per tant, podria ocórrer que el temps de quimioinvestigació que genera cada estímul estudiat (mascle, mascle castrat i femella) no estiguera relacionat simplement amb la seua rellevància biològica, sinó que es veïés incrementat en funció del seu component de *novetat*. Això podria emascarar diferències en quant a com d'atractius resulten de manera intrínseca cadascun dels estímuls estudiats. Fins i tot, podríem pensar que la investigació d'algun dels tres estímuls, com és el cas dels mascles intactes o castrats (veure discussió més endavant) es degués exclusivament a un efecte *novetat*, donat que estavem utilitzant femelles químicament verges.

Aquest efecte novetat podria explicar perquè a l'Experiment 1 no es veuen diferències entre el temps d'investigació de la borumballa de mascle castrat, mascle intacte i femelles, malgrat que els següents experiments demostren clarament que no tots tres tipus de senyals són igualment rellevants per a les femelles de ratolí.

Una forma de descartar l'efecte novetat és analitzar la dinàmica de quimioinvestigació dels estímuls d'interès *intra-sessió*, comparant el temps d'exploració que genera cadascun d'ells entre fraccions temporals consecutives d'una mateixa sessió. Una altra manera és analitzar la dinàmica de quimioinvestigació *entre sessions*, és a dir, comparar el temps d'exploració sobre cada senyal entre diverses sessions consecutives. De qualsevol d'aquestes dues formes el que fem és comparar la quimioinvestigació que genera cada senyal quan aquest és nou (en la primera fracció temporal o en la primera exposició), i quan no ho és (a les fraccions temporals o exposicions següents). A més, podem estudiar si es dona o no habituació del comportament d'exploració al llarg de les sessions, el que també ens proporciona informació sobre la significació biològica de cada estímulo.

Donats els resultats de l'Experiment 1, i amb l'objectiu d'intentar discriminar un possible efecte novetat, varem dissenyar l'Experiment 2. En aquest experiment estudiarem la dinàmica d'exploració de la borumballa embrutada per femelles, mascles castrats i mascles

intactes, en tres grups d'animals distints, durant 4 sessions consecutives (una per dia). A més, afegirem un quart grup al què els animals eren exposats a borumballa odorisada amb una olor sintètica que resulta neutra per a les femelles i que, previsiblement, indueix investigació solament degut a un efecte novetat donat que la citralva no sembla tindre cap rellevància biològica pels ratolins. Així, podiem comparar, a més, la dinàmica d'exploració de senyals de conespecífics amb la d'un senyal que no té significació biològica per a les femelles.

Escollirem la citralva com control per al nostre experiment perquè és una olor sintètica i no implicada en la comunicació intraespecífica, i que ha estat prèviament utilitzada en tests d'habituaçió-deshabituaçió (Sundberg et al., 1982; Baum and Keverne, 2002) per a analitzar la funció olfactiva en ratolí (Luo et al., 2002; Agustín-Pavón et al., 2007). En aquests tests d'habituaçió-deshabituaçió, els ratolins exploren significativament la citralva en una primera exposició d'un minut, però la seua quimioinvestigació decau ràpidament (veure capítol 1). Aquest fet encaixa perfectament amb un efecte novetat i indica que els ratolins no troben aversiva la citralva (Luo et al., 2002).

Els resultats de l'experiment 2 indiquen que la citralva a penes provoca exploració, mentre que les borumballes embrutades per diferents consespecífics desencadenen una exploració significativa al

llarg d'una (mascle castrat) o diverses sessions (femella i mascle intacte). Aquests resultats permeten descartar la influència de la novetat sobre els resultats de exploració de senyals de consespecífics als nostres tests, i suggereixen que la intensa exploració de la borumballa embrutada per consespecífics està reflectint la rellevància biològica dels senyals de femella, mascle castrat i mascle intacte per a les femelles de ratolí.

2.3.1.2 Efecte sostre

Els nostres tests d'elecció simple, tal i com estan dissenyats no permeten comparar més de dos estímuls simultàniament. Per tant, no podem estudiar en un mateix test quina de les tres borumballes (embrutada per femelles, mascles castrats o mascles intactes) és més preferida. Malgrat això, comparant la quimioinvestigació que genera cada estímul front a la que indueix un mateix estímul control (borumballa neta als nostres experiments) hom podria observar quina borumballa indueix una quimioinvestigació major i obtenir així una escala de preferències.

Això és precisament el que preteniem amb l'Experiment 1 però, com ja hem comentat, els resultats d'aquest experiment no mostren diferències entre el temps d'exploració del les tres borumballes estímul.

Aquest resultat es podria deure al que s'anomena *efecte sostre*, és a dir, que al paradigma experimental utilitzat, el comportament estudiat pot arribar a expressar-se fins un màxim no massa alt, un sostre. Si els distints estímuls induïren una exploració pròxima a aquest sostre potser no hi trobarien diferències significatives entre ells en tests d'elecció simple front a borumballa neta. Pensem que aquesta és la explicació més plausible per la absència de diferències entre les borumballes embrutades per diferents conespecífics en l'Experiment 1.

En aquests tests, la proporció que representa l'àrea ocupada per la borumballa estímulo, respecte de l'àrea total a explorar del conjunt de la caixa, és molt baixa. La caixa (Figura 22) té 50 x 25 cm de base i 30cm d'altura, dels quals aproximadament 10cm són realment explorables per les femelles. De manera que la superfície total de la caixa que pot ser investigada (en blau a la imatge) és de:

$50 \times 25 \text{cm (de la base)} + 10 \times (50 + 50 + 25 + 25; \text{de les parets}) = 2750 \text{ cm}^2$.

Cada potet té 8 cm de diàmetre (mesurem 1 cm al voltant), i per tant la seua superfície és d'uns 50 cm^2 . Per això, l'àrea que ocupa cadascun d'ells representa solament un 2% de la superfície total a explorar.

de ratolí

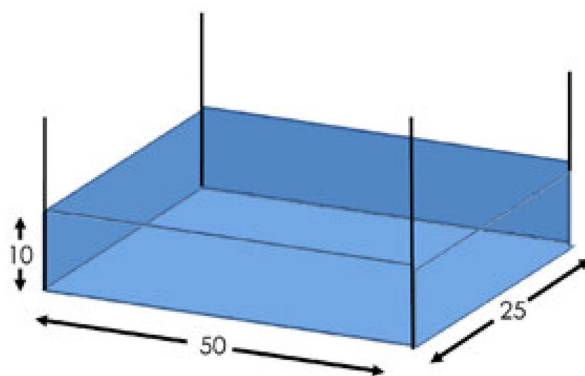


Figura 22. Esquema de la caixa de test utilitzada als tests d'elecció simple, al què s'indiquen les dimensions de llarg (50cm), ample (25cm) i altura explorable per les femelles de ratolí (10cm).

De fet, el temps que els animals inverteixen explorant el potet amb borumballa de conespecífics (ja siga de femella, mascle castrat o mascle intacte) varia entre uns 70 i 80 segons, el què representa un 23-27% del temps de test, que és de 5 minuts. Així doncs, tot i que sembla fàcil superar 70-80 segons d'exploració en un test de 300 segons, suposa un increment molt notable del temps que correspondria a una investigació a l'atzar de la caixa (un 2% de 300 segons són 6 segons).

Una possibilitat per estudiar quins senyals són més atractius tot evitant aquest efecte sostre, seria enfrontar-los dos a dos en tests d'elecció simple. Els tests que s'han realitzat en els què es compara la resposta investigadora cap a dos senyals distintes de conespecífics simultàniament (Novotny et al., 1985; Drickamer, 1989; Ninomiya i

Kimura, 1988; Keller et al., 2006b) indiquen que les femelles prefereixen els senyals de mascle, tant front a les de femella com als de mascle castrat. En el nostre laboratori hem demostrat que les femelles químicament verges mostren una preferència cap a la borumballa de mascle quan es confrontada a borumballa de femella (Moncho-Bogani et al., 2002) o a borumballa de mascle castrat (resultats de l' Experiment 5 en el present treball; Martínez-Ricós et al., 2007). A més, aquesta és una resposta comportamental bastant robusta, ja que s'ha mostrat independent dels nivells d'esteroides en femelles (Moncho-Bogani et al., 2004).

2.3.2 Les femelles de ratolí exploren de manera característica les borumballes de diferents conespecífics

Del que s'ha discutit abans es pot concloure que les femelles de ratolí mostren una tendència innata a explorar senyals químics de conespecífics (independentment del seu gènere o estat hormonal) que és clarament superior a la que mostren per explorar olors biològicament irrellevants com la citralva.

Però a més, quan analitzem la dinàmica d'exploració de les tres borumballes embrutades per conespecífics als tests de preferència consecutius de l'Experiment 2 observem que la dinàmica és diferent per cada tipus de borumballa. Així, la borumballa de mascle castrat

(Figura 17) indueix una investigació significativa el primer dia de test, però deixa de ser “atractiva” els següents dies d’experiment. En canvi, els senyals procedents de mascle intacte i femella són investigats de manera persistent (tant a la primera com a la segona sessió; Figura 17) sense evidències d’habitució comportamental. Aquest resultat indica que si bé les senyals de mascle castrat són més rellevants per les femelles que la citralva, no ho són tant com les de mascle intacte o les d’altres femelles.

Pel que fa a la borumballa embrutada per femelles, cal destacar que les femelles utilitzades en aquest experiment sí tenien experiència prèvia amb senyals d’altres femelles abans que els tests es portaren a terme. Així, el fet que investiguen aquestes senyals intensament demostra una vegada més que el test que fem servir no està detectant la exploració de la novetat, sinó que revela la significació biològica de l’estímul químic explorat.

D’altra banda, la borumballa de mascle és la única que continua sent explorada amb intensitat durant els dies 3, 4 i 5, el que ja apunta cap a un paper molt important d’aquests senyals per a les femelles.

De fet, els experiments 3 i 5 indiquen que la borumballa embrutada per mascles intactes, i en concret el seu component no volàtil, és la única capaç d’induir preferència de lloc, és a dir, és la única que té

proprietats reforçants per a les femelles, mentre que no ho són ni els senyals de mascles castrats ni els de femella.

A més a més, l'Experiment 4 mostra que la preferència de lloc condicionada que adquireixen les femelles de ratolí cap al pot en què troben les feromones reforçants de mascle durant les sessions d'aprenentatge, s'extingeix ràpidament. De fet, en la primera de les sessions d'extinció ja no s'observa que els animals passen més temps al pot en què s'hi dipositava la borumballa de mascle. Cal destacar que, en realitat, aquesta primera sessió d'extinció és el segon test en què les femelles són exposades a borumballa neta en els dos pots (al primer test de preferència de lloc també hi ha borumballa neta en ambdós recipients).

En conclusió, aquests experiments ens permeten concloure que la femella reconeix, a partir de la borumballa i dels senyals que aquesta conté, que hi ha passat un conespecífic, el seu gènere i, fins i tot, el seu estat hormonal (en el cas dels mascles), ja que les femelles mostren un comportament exploratori amb una dinàmica característica front a cadascun d'aquests senyals. Per tant, el conjunt dels experiments que hem realitzat ens permeten estudiar les capacitats de reconèixer aquests trets dels conespecífics

2.3.3 Les feromones sexuals masculines, un nou estímul reforçant per a les femelles de ratolí

2.3.3.1 Les feromones masculines indueixen preferència condicionada de lloc a les femelles.

Als Experiments 3 i 5 hem analitzat les propietats reforçants dels senyals continguts a la borumballa embrutada per mascles intactes, mascles castrats i femelles en diferents situacions experimentals. En tots dos experiments fem servir una adaptació del paradigma comportamental *place-conditioning* (que anomenem paradigma d'adquisició de preferència condicionada de lloc). Aquest paradigma es basa en el fet que quan un estímul que té propietats reforçants es presentat de manera sistemàtica en la mateixa posició d'una caixa de test al llarg d'una sèrie del que anomenem sessions d'aprenentatge, els animals desenvolupen una preferència condicionada per aquesta localització de la caixa, que manifesten inclús en absència de l'estímul reforçant.

Com ja hem comentat al punt 2.2.4.1 hem fet servir una adaptació particular del mètode de Crowder i Hutto, 1992, al qual durant les sessions d'aprenentatge, l'animal és lliure de recórrer tota la caixa i, per tant, pot investigar de manera activa tot el que aquesta conté, inclosos els pots amb els estímuls, i la obtenció del reforç (la

borumballa) serà conseqüència del seu comportament exploratori. Aquest procés és equivalent al fet que la pressió d'una palanca es veja reforçada per l'obtenció d'una recompensa a un paradigma operant clàssic en caixa d'Skinner. Per tant, el mètode utilitzat per nosaltres, si bé està basat en el paradigma clàssic de *place preference*, és de caràcter instrumental (Corwder i Hutto, 1992).

En aquest punt és important destacar, que l'únic intent de demostrar les propietats reforçants de les feromones sexuals en rosegadors que s'havia realitzat fins ara és el portat a terme per Coppola i O'Connell, al 1988. Al seu treball es testaven les propietats reforçants de les feromones sexuals de femella per a mascles de hámster, en una tasca operant en la què els mascles havien de pressionar una palanca per obtenir flux vaginal de femella (*vaginal discharge, HVD*), que constituïa la recompensa. Els resultats indicaren que la resposta de pressionar la palanca no es veia reforçada. Però cal destacar el fet que la HVD va ser presentada com una beguda (era diluïda en aigua i administrada com una beguda, fins i tot els hámsters havien estat privats d'aigua prèviament) i no com a font de feromones. Per tant, probablement la causa d'aquests resultats fora que el disseny experimental no era l'adequat. Amb aquest disseny, els resultats, més que negatius, són inconclusius, i posen de manifest com d'important és plantejar un disseny

experimental apropiat per a cada cas en funció de les característiques concretes de l'estímul.

El nostre paradigma d'adquisició de preferència condicionada de lloc, en canvi, està dissenyat adequadament per estudiar les propietats reforçants de les feromones sexuals, perquè la forma en què les femelles poden accedir a l'estímul reforçant, les feromones, és explorant borumballa embrutada per conespecífics i detectant-les a través del seu sistema vomeronasal, d'una forma molt semblant a com ho farien en condicions naturals.

Aplicant aquest paradigma, doncs, l'Experiment 3 mostra, com ja hem comentat abans, que la borumballa embrutada per mascles intactes conté senyals químics que són reforçants per a femelles de ratolí. I els de l'Experiment 4 mostren que l'adquisició de preferència de lloc induïda per les feromones sexuals de mascle s'extingeix ràpidament, ja que a la primera sessió d'extinció les femelles ja no passen significativament més temps sobre el pot que contenia la borumballa embrutada per mascles durant les sessions d'aprenentatge. D'altra banda, el fet que els senyals de femella no provoquen adquisició de preferència de lloc malgrat induir una intensa investigació (experiments 1 i 2), demostra que els resultats obtinguts respecte de les propietats reforçants de les feromones masculines no són inespecífics.

*Capítol 2. Les feromones sexuals de mascles són reforçants per a les femelles
de ratolí*

A més a més, els resultats de l'Experiment 5 demostren que perquè la borumballa embrutada per mascles tinga propietats reforçants per a les femelles, cal que aquestes puguen fer contacte directe amb ella. Això indica que almenys part d'aquests senyals són no volàtils. De fet, tant la preferència incondicionada com el desenvolupament de preferència de lloc induïda per la borumballa embrutada per mascles (Figura 21) requereixen del contacte directe amb aquesta. Per tant, aquests resultats, junt amb els obtinguts al capítol anterior, ens permeten concloure que la borumballa de mascle conté senyals químics no volàtils i detectats per l'OVN que tenen propietats reforçants per a femelles de ratolí.

Ja la dècada dels 80' el grup de Beauchamp i col·laboradors (Beauchamp et al., 1982, 1983, 1985) demostraren que l'orina de les femelles de conillets d'Índies indueix un intens comportament d'investigació en mascles, però que aquesta resposta decau amb el temps, fins desaparèixer, en animals amb l'OVN lesionat. La interpretació que aquests autors donaren als seus resultats fou que les femelles de conillets d'Índies generen algun tipus de senyal que en ser detectada per l'òrgan vomeronasal dels mascles tindria propietats reforçants per aquests, de manera que induiria una intensa quimioinvestigació dels mascles cap a les marques de femella. Aquests senyals reforçants podrien ser associats a altres estímuls de les femelles, com per exemple senyals volàtils oloroses,

de manera que aquests reforçants secundaris causarien també una resposta quimioinvestigadora. De la mateixa manera que ocorre amb qualsevol aprenentatge associatiu, l'exposició a l'estímul condicionat sense la presència de l'estímul incondicionat, acaba produint una extinció de la resposta condicionada. Així, en aquest cas, la lesió de l'OVN i, per tant, la incapacitat dels mascles de detectar les feromones reforçants, produiria una lenta extinció de la resposta quimioinvestigadora generada pels volàtils, ja que aquests perdrien el seu valor reforçant condicionat. Aquesta interpretació s'ajusta perfectament als nostres resultats d'aquest capítol i del capítol anterior.

La identitat del senyal químic masculí reforçant és, hui per hui, una qüestió molt debatuda (veure baix). Les nostres dades aporten informació valuosa per aquest debat. Així, la diferència entre les respostes comportamentals de les femelles cap a la borumballa embrutada per mascles intactes i per mascles castrats als experiments 2, 3 i 5 demostra que aquests senyals dels mascles es produeix de forma dependent de testosterona. A més, donat que la resposta que aquesta(es) substància(es) desencadenen en les femelles són innates o estereotipades (atracció i reforç), podem afirmar que aquests senyals masculins encaixen perfectament en la definició del què seria una feromona sexual (veure Introducció). Per tant, els experiments dels capítols 1 i 2 en conjunt, ens permeten

concloure que la borumballa embrutada per mascles conté feromones sexuals no volàtils detectades per l'OVN, i que són reforçants per a femelles de ratolí.

Aquests resultats constitueixen la primera demostració en mamífers de l'existència de feromones sexuals, implicades en l'atracció intersexual, i indiquen que això és degut a les propietats reforçants incondicionades (no apreses) que les feromones sexuals tenen per als congèneres de l'altre sexe.

2.3.3.2 La significació biològica del valor reforçant de les feromones sexuals

En la comunicació intraespecífica en rosegadors són de gran rellevància les marques (senyals químics) deixades a l'entorn per certs individus i que són detectades per altres individus. Com hem vist anteriorment, a partir d'aquests senyals els ratolins poden reconèixer la presència d'un conespecífic, el seu gènere i fins i tot el seu estat hormonal, el que té molt a veure amb el seu estatus de dominància dins del grup social al què pertanyen (veure Hurst i Beynon, 2004). Per això, quan els mascles deixen marques a l'entorn no sols delimiten quin és el seu territori sinó que deixen un senyal honest del seu estatus de dominància tant per altres mascles competidors, com per femelles. A partir d'aquestes marques, les femelles poden valorar la qualitat d'un mascle com a possible parella

sexual. De fet, existeix una correlació entre l'estatus de dominància, la grandària del territori que defensa i el número de còpules amb femelles que els mascles realitzen (Crowcroft i Rowe, 1963; Poole i Morgan, 1976). Per tant, mantenir les marques pròpies i no deixar que els mascles competidors deixin les seues al seu territori és de vital importància perquè els mascles mantinguen la seua posició de dominància, el que en últim terme determinarà les seues probabilitats de ser escollits com a parella sexual i reproduir-se. És per això que els mascles contramarquen (dipositen marques pròpies sobre, o a prop) els senyals de mascles competidors (Hurst i Beynon, 2004), per fer prevaldre les seues.

D'altra banda, el contramarcatge també es realitza sobre marques de possibles parelles sexuals (veure Hurst 1990 a,b i c, Rich i Hurst 1999 i Hurst i Beynon, 2004). De fet, quan les femelles troben marques d'un mascle que els sembla una bona parella sexual, deixen una marca pròpia a sobre o prop d'ella per informar-los de la seua presència i afavorir així un encontre sexual amb aquest individu (Hurst i Beynon, 2004).

En aquest context el valor reforçant de les feromones sexuals podria ser crític, perquè d'una banda podria ser la causa de que les femelles investigaren intensament els senyals de mascle, és a dir, podria reforçar aquest comportament. Com hem vist, aquesta exploració pot ser de gran importància en el context de la reproducció. A més,

podria ser la garantia de que les femelles contramarcaren els senyals de mascle o, fins i tot, de què romangueren properes al lloc on han trobat aquesta marca, el que afavoriria l'encontre sexual amb el mascle responsable del senyal.

També és important destacar que les marques que deixen els mascles a l'entorn són no volàtils (Hurst i Beynon., 2004), la qual cosa presenta l'avantatge que no es dispersen i perduren al lloc on l'individu les ha deixades més temps que si foren volàtils (Armstrong et al., 2005). Però aquest fet té l'inconvenient que no poden ser detectades a distància.

Atenent als nostres resultats, aquestes marques contindrien les feromones sexuals no volàtils i reforçants, que serien responsables de que les femelles les investigaren. Potser també contindrien molècules volàtils, però que resultarien neutres per a femelles sense experiència prèvia amb senyals de mascle i, per tant, no resultarien atractives malgrat que foren detectades a distància. Per això cal que les femelles facen contacte directe amb les marques per identificar-les com a senyals de mascle i portar a terme els comportaments d'investigació i/o contramarcatge corresponents.

Però com indiquen els resultats de Moncho-Bogani i col·laboradors del 2002 i els del Capítol 1 d'aquesta tesi, les femelles adquireixen una preferència pels volàtils de mascle que a priori els resultaven neutres després de l'experiència conjunta aquests volàtils i les

feromones sexuals reforçants. Per tant, durant el contacte amb les marques de mascle, les femelles podrien adquirir preferència pels volàtils que aquestes contenen. D'aquesta forma, quan les femelles detectaren els volàtils d'un mascle a distància, ara sí que els resultarien atractius, i s'hi aproximarien.

De fet, Ramm et al., (2008) han trobat, que les femelles sense experiència prèvia amb mascles requereixen del contacte directe amb l'orina de mascle per a preferir-la front a la d'altres femelles, però que una vegada tenen experiència amb mascles si prefereixen els volàtils de la seua orina. Aquests resultats estan en total coherència amb els nostres, i corroboren que cal de l'associació dels volàtils, que en principi són neutres, amb no volàtils reforçants, perquè els primers puguen adquirir significació i les femelles se'n senten atretes.

La peculiaritat dels resultats de Ramm et al., (2008) respecte dels nostres, és que aquest treball mostra que l'associació és específica per a un mascle en particular, és a dir, que les femelles adquireixen una preferència pels volàtils del mateix mascle de qui provenien les feromones no volàtils amb les què han tingut contacte prèviament. Aquest resultat té molt de sentit en el context de la comunicació intersexual a través de marques deixades a l'entorn, ja que significaria que en contactar amb una marca no volàtil i reforçant d'un mascle concret, les femelles desenvoluparien preferència pels

volàtils d'aquest mascle i no d'un altre, cap als què ara si que se'n sentirien atretes.

En conclusió, la rellevància biològica del valor reforçant de les feromones sexuals tindria a veure per una banda amb assegurar els comportaments d'investigació i potser contramarcatge dels senyals de mascle per part de les femelles, que tanta importància tenen en el context de la reproducció. A més, facilitaria que les femelles desenvoluparen preferència per volàtils de mascle, de manera que s'optimitzaria la trobada d'aquests des de la distància. A més, pel que indiquen els resultats de Ramm et al., (2008), el procés seria tan específic que les femelles adquiririen preferència de manera concreta pels volàtils del mascle les marques no volàtils dels quals han estat investigades prèviament i han resultat més atractives (per exemple per tractar-se d'un mascle dominant amb nivells molt alts de testosterona).

2.3.4. El significat biològic de la intensa exploració de la borumballa de femella

Tant els resultats de l'Experiment 2 com els del 3 posen de manifest que les femelles de ratolí investiguen molt intensament els senyals provinents d'altres femelles. Atenent al fet que les feromones femenines no tenen propietats reforçants per a altres femelles (ja no

que indueixen preferència de lloc, com mostra l'Experiment 3), se'ns planteja la qüestió del per què d'aquesta intensa exploració.

Com ja hem explicat anteriorment, la borumballa embrutada per conespecífics conté una gran quantitat de senyals químics que proporcionen informació sobre la identitat, el gènere i l'estat hormonal (i de dominància) dels individus que han deixat eixes marques. També hem parlat de la rellevància que tenen aquestes marques en la comunicació entre mascles, i entre mascles i femelles. Ara bé, les femelles també deixen marques a l'entorn que contenen informació rellevant per a altres femelles (Hurst 1990 a, b i c), si bé no amb connotacions sexuals sino agonístiques. Per exemple, les femelles dominants d'una colònia, deixen un patró de marques característic per delimitar el seu territori. Així, el defensen de femelles dominants d'altres colònies, i també mantenen la seua posició dominant dins la jerarquia de la pròpia colònia. De forma similar a com ho fan els mascles, les femelles també contramarquen senyals d'altres femelles per a intentar mantenir la seua supremacia d'un territori (Hurst 1990 a, b i c).

Per tant, no és estrany que les femelles investiguen durant tant de temps els senyals provinents d'altres femelles als nostres tests, ja que aquestes contenen informació molt rellevant per a la seua supervivència. Fins i tot podria ocórrer que durant aquesta

exploració també estigueren contramarcant els senyals que hi troben d'altres femelles.

Pel què fa a la identitat química de les feromones de femella hi ha pocs estudis sobre aquest tema. S'ha trobat una molècula que es troba en l'orina de femella de ratolí i endarrereix la pubertat en altres femelles la *2,5-dimethylpyrazina* (Novotny et al., 1985; Jemiolo et al., 1989). Però malgrat això, la majoria dels treballs que estudien la naturalesa química de les feromones de femella analitzen els senyals que tenen efectes sobre mascles, és a dir, busquen la identificació de les feromones sexuals de femella implicades en la comunicació intersexual.

En aquest sentit, la feromona femenina més coneguda és l'*afrodisina* (veure revisió Briand et al., 2004). Amb el terme *afrodisina* (Singer et al., 1990; Briand et al., 2000) es coneix la feromona sexual que es troba al flux vaginal de les femelles de hámster daurat (*Mesocricetus auratus*) i que indueix el comportament de munta dels mascles (Singer et al., 1986). L'expressió del gen de l'*afrodisina* és alta a les glàndules del cervix de l'úter de les femelles de hámster i la proteïna es troba a la superfície de la vagina i és alliberada al flux vaginal de femella (*vaginal discharge, HVD*; Kruhoffer et al., 1997). La detecció d'aquesta feromona es produeix sense cap dubte a través de l'òrgan vomeronasal, ja que l'exposició dels mascles a ella indueix l'activació de l'OVN (Singer et al., 1986; 1987) i, a més, els efectes

comportamentals de l'afrodisina són abolits per l'eliminació de l'OVN (Clancy et al., 1984). D'altra banda, la seua estructura es coneix perfectament, ja que l'afrodisina ha estat aïllada i caracteritzada, i s'ha vist que té una similitud estructural amb les proteïnes principals urinàries dels mascles de ratolí (*Major Urinary Proteins* o MUPs) molt alta (Henzel et al., 1988; Magert et al., 1995). Malgrat això no hi ha cap tipus d'evidència de que l'*afrodisina* unisca molècules volàtils com si fan les MUPs, el què apunta que l'efecte feromonal d'aquesta proteïna es deu a ella mateixa, i no a la unió amb alguna altra substància (Singer et al., 1990). De fet, l'*afrodisina* no perd el seu efecte malgrat que se li someta a tractaments amb els quals se eliminen els volàtils, esteroides o pèptids als què poguera estar unida (Singer et al., 1984).

Seria possible que l'afrodisina provocara una resposta sexual en mascles i de caràcter agonístic en femelles de la mateixa manera que altres feromones tenen un efecte sobre individus del mateix gènere i totalment oposat als dels gènere contrari. Aquest és el cas, per exemple, de la brevicomina i la tiazolina, secretades per mascles i que produeixen respostes agressives per part d'altres mascles i atracció per part de les femelles.

En tot cas, aquesta seria una hipòtesi que caldria comprovar.

2.3.5. La borumballa de mascle castrat conté senyals d'identitat

Els resultats de l'Experiment 2 ens permeten concloure que la investigació de borumballa embrutada per conespecífics es deu a la seua rellevància biològica, fins i tot per al cas de la borumballa de mascle castrat. Aquests resultats semblen sorprenents, atenent al fet que la borumballa de mascle castrat no conté senyals que identifiquen gènere o estatus de dominància (que depenen de testosterona; Albers et al., 2002). D'altra banda, hem vist abans que els rosegadors són capaços de discriminar entre diferents individus, i per tant, deuen existir senyals que codifiquen aquesta identitat o perfil genètic. Aquests senyals podrien ser els responsables de la investigació que genera la borumballa de mascle castrat.

Les olors associades al Complex Major d'Histocompatibilitat de tipus I (MHC I, de l'anglès *Major Histocompatibility Complex I*), implicades en la resposta immune, semblen tenir un paper en el reconeixement de la individualitat tant en rosegadors com en humans (Eklund 2000; Ferstl et al., 1992; Wedekind et al., 1995). Aquestes complexos són glicoproteïnes insertades en les membranes cel·lulars, formades per dues cadenes (la pesada, α , i la lleugera, β), organitzades de manera que formen un únic lloc d'unió al qual interaccionen amb ligands (Figura 23)

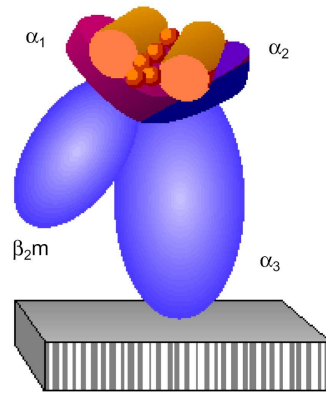


Figura 23. Estructura molecular de les cadenes α i β del complex major d'histocompatibilitat (adaptat de Singh, 2001). La cadena pesada consta de tres dominis (α_1 , α_2 , α_3) i la cadena lleugera d'un sol, la β -microglobulina (β_2m). Els dominis α_1 i α_2 s'enllacen de manera que formen una plataforma d'unió a la que pot unir-se un pèptid d'uns nou aminoàcids. La cadena β_2m estableix la unió d'aquest pèptid i afavoreix que tota la molècula romanga unida a la membrana cel·lular.

Aquest lloc d'unió està normalment ocupat per fragments proteics del propi individu, resultat de la proteòlisi de polipèptids endògens. Quan es dona una infecció aquest lloc d'unió pot ser ocupat per pèptids derivats de l'organisme infecció, i és el complex resultant el que es reconegut pel sistema immune com a indicatiu de la infecció.

Les MHC I són polimòrfiques, i d'enorme variabilitat entre individus, tant més distintes quant menor és el parentesc entre els individus, el que les fa serioses candidates per a ser les responsables de codificar la individualitat. A més, el polimorfisme d'aquestes proteïnes també es dona dins del mateix individu, de manera que la variabilitat en la

conformació dels llocs d'unió, i per tant, en l'espectre de mol·lècules que poden unir també és enorme.

D'altra banda, s'ha vist que aquests complexos també es troben en la sang, l'orina i la limfa, i la seua secreció no sembla regulada per testosterona (Peele et al., 2003). Tot això ha fet que es propose la teoria del Transportador (*Carrier Hypothesis*: Singh et al., 2001), segons la qual, a més d'unir fragments proteics, el lloc d'unió de les MHC I podria unir també molècules menudes, volàtils (olors). Així, després de determinats processos de proteòlisi, el complex es degradaria progressivament, fins que solament quedara el lloc d'unió amb aquest volàtil (que tindria un pes molecular aproximat de 27 KDa; Figura 24). Aquest pèptid derivat de les MHC I seria excretat al medi a través de l'orina portant amb ell una substància volàtil olorosa, i actuant com a reservori de la mateixa d'igual forma que ho puguen fer les MUPs (veure discussió anterior) o altres lipocalines.

Degut a l'alt polimorfisme de les MHC I entre distints individus, també ho serà l'espectre de volàtils units a MHC I, de manera que el perfil olorós MHC i-volàtils que excrete cada animal seria únic, i per tant, podria ser suficient per a codificar la seua identitat.

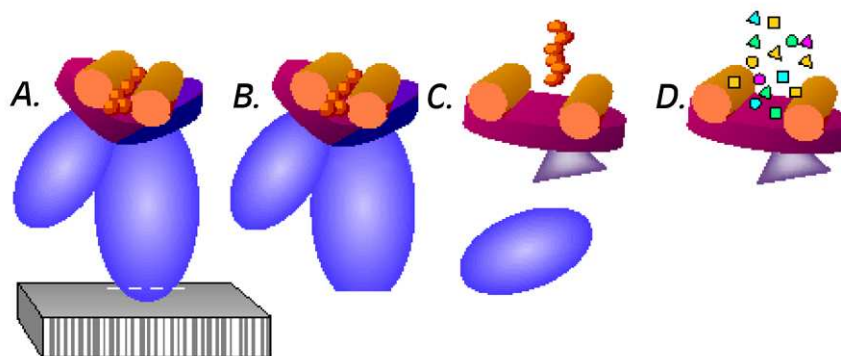


Figura 24. Esquema de la hipotètica ruta de les molècules de MHC des de la membrana de les cèl·lules fins a l'orina (adaptat de Singh, 2001). **A.** L'ancorament de la molècula a la membrana es trenca i aquest queda lliure en forma soluble en la circulació. **B.** La molècula circula com un heterodímer, format per les cadenes α i β . **C.** Les cadenes α i β també es separen entre si, el que té com a conseqüència un canvi conformacional que fa es solte el pèptid unit. **D.** La molècula resultant, que té lliure el lloc d'unió és capaç d'unir un ampli espectre de molècules, com per exemple volàtils.

Aquesta teoria cobrà força quan es va caracteritzar l'expressió de gens del MHC en les neurones de l'òrgan vomeronasal (Ishii et al., 2003; Loconto et al., 2003), el que va proporcionar una via sensorial i anatòmica que suportava aquesta hipòtesi.

El descobriment que en ratolins podia haver olors que indicaren individualitat i que estigueren relacionades amb el MHC el va fer Yamakazi i col·laboradors al 1976, qui va veure que els ratolins eren capaços de distingir entre les olors de dos animals que solament diferien en el seu perfil MHC. A banda, s'ha testat la seua implicació en la codificació de la individualitat mitjançant experiments de tria de parella (*mate choice*), tant per part dels mascles (Yamakazi et al.,

1976), com per part de les femelles (Potts et al., 1991), així com en experiments d'inducció d'avortament (*pregnancy block* o efecte Bruce; (Yamakazi et al., 1983b, Leinders-Zufall et al., 2004) en els que s'ha vist que solament canviant el perfil d'aquests pèptids en l'orina del mascle que ha deixat prenyada a una femella, el contacte amb aquesta orina indueix avortament en la femella (Leinders-Zufall et al., 2004) el que vol dir que la femella es capaç de detectar que es tracta d'un mascle diferent. A banda, també s'ha demostrat que participen en el marcatge de parentesc (Manning et al., 1992; Yamazaki et al., 2000).

A les MUPs, també se'ls ha trobat un paper relacionat amb el marcatge d'individualitat (Hurst et al., 2001) en el context de la comunicació entre mascles. Donada la seua estructura també poden unir mol·lècules volàtils i actuar com a reservoris d'aquests volàtils, o fins i tot tenir un paper feromonal propi, però s'ha vist que la seua secreció depèn de testosterona (Peele et al., 2003), per tant no serien les responsables de la investigació que genera la borumballa de mascle castrat.

.

3. CAPÍTULO 3:

Circuit neural del reforç de feromones: inducció de l'expressió del proto-oncogen c-fos.

3.1 INTRODUCCIÓ

Els estudis realitzats als capítols anteriors demostren que els mascles de ratolí secreten o excreten certes feromones sexuals que tenen propietats reforçants per a les femelles. A més, hem demostrat que aquestes feromones són detectades per l'òrgan vomeronasal, i no mitjançant el sistema olfactiu principal.

Aquestes dades demostren, per tant, l'existència d'un nou estímul reforçant natural, les feromones sexuals, i plantegen la interessant qüestió de quins són els mecanismes neurals del reforç induït per aquests estímuls. Més específicament, resulta important investigar si les propietats reforçants de les feromones són processades pels mateixos circuits que utilitzen altres estímuls reforçants, detectats per altres sistemes sensorials, com ara el sabor dolç. És a dir, existeix un únic sistema neural del reforç? O pel contrari cada tipus d'estímul té circuits i mecanismes propis per la senyalització del reforç?

Clàssicament, la projecció que s'ha considerat crítica en relació als mecanismes del plaer i el reforç, és la via dopaminèrgica tegmento-estriatal, que connecta l'àrea tegmental ventral (ATV) amb el nucli accumbens. De fet, la hipòtesi clàssica sobre el paper de la dopamina en la hedònia proposada formalment per Wise i Rompré (1989), suposava que l'alliberament de dopamina al nucli accumbens des

dels terminals tegmentals era el fenomen causal del plaer. Aquesta hipòtesi es basava fonamentalment en resultats d'experiments d'autoestimulació intracerebral i en l'efecte de fàrmacs antagonistes de la dopamina en els comportaments instrumentals induïts per estímuls gratificants. En aquest sentit, algunes dades experimentals més recents utilitzant paradigmes poc instrumentals, suggereixen que la gratificació i el reforç induït pel sabor dolç de la sacarosa o la sacarina depèn en gran mesura d'aquesta via (per a una revisió veure Wise, 2004). Així, petites lesions de les neurones dopaminèrgiques de l'ATV disminueixen significativament la preferència dels animals per una solució endolcida amb sacarosa front a aigua (Shimura et al., 2002; Martinez-Hernandez et al., 2006). A més, els animals amb lesions grans de l'AVT mostren afàgia (manca total d'ingesta de menjar sòlid) i adipsia (manca absoluta d'ingestió d'aigua i líquids; Martínez-Hernández et al., 2006), que suggereixen un paper clau de la via dopaminèrgica tegmento-estriatal en els comportaments apetitius d'ingesta (Yoshida et al., 1992; MacDonald et al., 2004) donant així recolzament a la hipòtesi dopaminèrgica de la hedònia.

De fet, les últimes investigacions del grup de Kent Berridge, del "Affective Neuroscience and Biopsychology Laboratory" de la Universitat de Michigan (USA) han demostrat que la neurotransmissió opioidèrgica a l'escorça (*shell*) del nucli accumbens

(NAC) hi juga un paper fonamental en la senyalització de les propietats reforçant del sabor dolç. Així, els fàrmacs agonistes dels receptors per als opiodes del tipus μ potencien el plaer del sabor dolç, mesurat per les expressions facials d'hedònia, només si s'apliquen intracerebrament a un locus concret de l'escorça del NAC (Peciña i Berridge, 2005).

Però, des de la seua formulació, la hipòtesi dopaminèrgica de la hedònia ha rebut fortes crítiques ben fonamentades i, conseqüentment, les idees sobre la neurobiologia del reforç han anat modificant-se sensiblement al llarg dels últims anys. D'una banda, els circuits dels reforç s'han ampliat incloent-hi altres centres profusament connectats amb el nucli accumbens i l'AVT, i interconnectats entre ells. Així, l'escorça prefrontal medial (EPFm) i l'amígdala basolateral reben projeccions dopaminèrgiques des del tegment (Swanson, 1982; Martínez-Hernandez, 2008/9), i tots dos centres projecten a l'estriat ventral i estan connectats entre ells de forma recíproca. És a dir, les àrees de l'amígdala basolateral i de l'EPFm que projecten a una mateixa porció de l'estriat ventral estan interconnectades (McDonald, 1991). Per aquesta raó, entre d'altres, actualment hom considera el còrtex prefrontal medial (Routtenberg i Sloan, 1972) i l'amígdala basolateral (Baxter i Murray, 2002) com nodes importants en el circuit cerebral del reforç. A més, hi ha una sòlida evidència de que no sols el nucli accumbens, sinó també altres

zones de l'estriat com ara el tubercle olfactiu (Ikemoto, 2003) participen en els processos de reforç, almenys en els induïts per drogues addictives. Així doncs, les dades experimentals disponibles en l'actualitat indiquen clarament que el circuit cerebral del plaer és quelcom més que la connexió dopaminèrgica entre la ATV i el nucli accumbens, incloent-hi a més diferents regions de l'estriat ventral, el còrtex prefrontal i l'amígdala, així com altres neurotransmissors (Kelley i Berridge, 2002).

D'altra banda, als últims anys s'acumulen dades que indiquen l'existència de mecanismes de gratificació, parcial o totalment independents de la projecció tegmento-estriatal dopaminèrgica (veure Spanagel i Weiss, 1999; Berridge i Robinson, 2003). Per això, el paper d'aquesta projecció en els processos de reforç comportamental està sent revisat (Wise, 2005). En aquest sentit, s'ha suggerit que la dopamina no està implicada en la senyalització del valor hedònic dels estímuls, sinó d'altres característiques d'aquests tals com la seua novetat o rellevància, o del valor dels estímuls com a predictors de un reforç imminent (veure Schultz, 2007).

Donat que la major part dels estudis sobre els mecanismes del reforç s'han dut a terme usant com a estímuls reforçants el menjar, el sabor dolç o drogues d'abús, el descobriment d'un nou tipus d'estímul reforçant natural, les feromones sexuals (Capítol 2) pel nostre grup, ens permet re-estudiar la qüestió per comprovar si la via

ATV-escorça del NAC està implicada en la senyalització del reforç de feromones de la mateixa manera a com ho està al reforç d'altres estímuls plaents, o si els mecanismes de senyalització del reforç de feromones son diferents dels d'altres estímuls reforçants naturals.

En aquest sentit, els estudis de José V. Moncho-Bogani sobre l'expressió de c-fos induïda per l'exploració de les feromones masculines a femelles de ratolí, indiquen que l'ATV de femelles químicament verges no és activada per feromones masculines, però en canvi si ho es l'escorça del NAC (Moncho-Bogani et al., 2005). Això suggereix una activació de l'estriat ventral independent de la via tegmento-estriatal clàssica. De fet, les lesions *excitotòxiques* de l'ATV realitzades per José Martínez-Hernandez, eliminaven la preferència per sacarosa però no alteraven la preferència innata que les femelles mostren cap a feromones masculines. Per tant, confirmaven que mentre el reforç de la sacarosa depèn de la via tegmento-estriatal clàssica, el de les feromones sexuals vindria mitjançat per vies anatòmiques alternatives (Martínez-Hernández et al., 2006). Aquesta hipòtesi es recolzada pels resultats de Carmen Agustín-Pavón, qui injectant intraperitonealment fàrmacs va comprovar que els antagonistes de la dopamina no tenen cap efecte sobre la preferència innata que les femelles mostren cap a les feromones de mascle, mentre que els agonistes l'eliminen (contràriament al que prediu la hipòtesi de la dopamina; Agustín-Pavón et al., 2007).

Totes aquestes dades en conjunt ens fan preguntar-nos quina podria ser la ruta anatòmica alternativa, no dopaminèrgica, responsable del plaer induït per les feromones de mascle a les femelles del ratolí. Més en concret, quina zona de l'estriat ventral és activada per l'exposició a feromones sexuals de mascle.

Com hem mostrat al Capítol 1 d'aquesta tesi, les feromones reforçants de mascle són detectades per l'òrgan vomeronasal, que està connectat amb l'encèfal a través del bulb olfactiu accessori (BOA). El BOA projecta, fonamentalment, sobre el nucli posteromedial de l'amígdala cortical (CoApm), sobre l'amígdala medial i sobre el nucli lilit de la stria terminalis (Broadwell, 1975; Scalia i Winans, 1975; von Campenhausen i Mori, 2000; Mohedano-Moriano et al., 2007). De entre aquests nuclis vomeronasals secundaris, sols el CoApm origina importants projeccions directes a l'estriat ventral (Novejarque, 2007/08). Els resultats del transport anterògrad de traçadors neuroanatòmics injectats al CoApm, indiquen que, tant al ratolí (Novejarque 2007/08), com a la rata (Ubeda-Bañon et al., 2008), les projeccions d'aquest centre vomeronasal inclouen els illots de Calleja (ICj) més medials (incloent-hi el illot principal o magne), el tubercle olfactiu medial (Tu) i els ponts cel·lulars de l'estriat ventral (CB) adjacents. D'altra banda, l'àrea amígdalo-hipocàmica (AHA), malgrat no rebre projecció vomeronasal directa, rep projeccions de l'amígdala medial (MeA;

Gomez and Newman, 1992 i Canteras et al., 1995; Martinez-Garcia et al., 2008) i del nucli del tracte olfactiu accessori (BAOT; de l'anglès *bed nucleus of the accessory olfactory tract*), que sí reben projecció directa del BOA (Scalia i Winnans 1970; Ubeda-Bañón et al., 2008, Von Capenhausen i Mori, 2002). L'AHA també projecta sobre illots de Calleja (Novejarque 2007/2008). Per tot això, la connexió del CoApm/AHA amb illots de Calleja, tubercle olfactiu i els ponts cel·lulars (CB) es presenta com una ferma candidata a ser una connexió clau en el reforç degut a feromones sexuals.

Per tot això, en aquest capítol explorem el possible paper d'aquesta via anatòmica en la detecció de feromones masculines reforçants a les femelles de ratolí, mitjançant l'anàlisi de l'expressió de c-fos induïda al cervell de les femelles per l'exploració de borumballa embrutada per mascles durant tests d'elecció simple front a borumballa neta. En concret, analitzem quantitativament l'expressió de c-fos al CoApm, AHA i als illots de Calleja medials, receptors de la projecció vomeronasal terciària (Novejarque, 2007/08; Ubeda-Bañón et al., 2008), així com als illots de Calleja laterals, que aparentment no la reben i que ens val, per tant, com a un molt bon control.

3.2 MATERIALS I MÈTODES

3.2.1 Disseny experimental

Perquè els nuclis esmentats estiguen implicats en el reforç induït per feromones és condició necessària que siguin activats per les mateixes durant l'exploració de la borumballa embrutada per mascles. Per això, al present experiment analitzarem l'activació de les neurones d'aquests nuclis (mesurada com la densitat de cèl·lules que expressaven nivells detectables de c-fos) en resposta a l'exploració de borumballa embrutada per mascles durant un test de preferència front a borumballa neta. Com a grup control usarem animals que havien passat per un test amb borumballa neta a tots dos costats de la caixa de test, de forma que havien explorat una caixa idèntica però no hi havien tingut la oportunitat de detectar feromones masculines.

L'exploració va ser curosament analitzada, de forma que, dels mateixos animals als quals hem analitzat l'expressió de c-fos, coneixíem les dades del temps d'exploració de la borumballa. Això permet confirmar que, en efecte, les femelles del grup exposat han detectat la feromona masculina (mostrant preferència pel pot que la conté), i a més permet fer estudis de correlació entre el comportament i l'expressió de c-fos als diferents nuclis. D'altra banda, si dos nuclis cerebrals estan connectats de forma que, en

última instància, l'activitat de l'u és dependent de la de l'altre, hi haurà correlació en tots els animals entre el grau d'activació (expressió de c-fos) dels dos nuclis. Per tant, la tècnica emprada sembla útil per comprovar si els esmentats nuclis formen un sistema funcional implicat en la detecció de les feromones reforçants.

La realització del test d'elecció simple i el processat del material histològic sobre el que s'ha fet l'anàlisi d'expressió de c-fos que comprèn aquest capítol és treball previ del nostre grup, publicat parcialment per Moncho-Bogani et al. (2005). Per la present tesi hem analitzat el material de la col·lecció de preparacions del grup pertanyent a aquells experiments.

3.2.2 Animals

Per a aquest experiment es feren servir 12 femelles adultes i químicament verges (veure Moncho-Bogani et al., 2002; 2005 o capítols anteriors d'aquesta tesi), assignades aleatòriament al grup Exposat (sotmeses a tests de preferència entre borumballa neta i embrutada per mascles intactes; N/M, n=6) o al grup Control (sotmeses a tests control als quals ambdós pots contenien borumballa neta; N/N, n=6). Les femelles de tots dos grups van ser estabulades individualment en gàbies grans (25x50x30cm) fins el final de l'experiment.

3.2.3 Proves comportamentals

Els tests d'elecció simple es van realitzar a les mateixes gàbies en les què les femelles estaven estabulades. Amb això es pretenia minimitzar l'activació cerebral dels animals deguda a la manipulació dels mateixos. A les gàbies s'hi introduïren des del començament de l'experiment dos recipients de vidre de dimensions 5 x 12 x 12 cm, localitzats a cantons oposats de la caixa.

Durant els 4 dies previs a la realització del test, els animals foren habituats durant 10 minuts diaris a la introducció de la borumballa als pots. Durant aquestes sessions els dos recipients de la caixa contenien 12g de borumballa neta cadascun. A continuació, el dia del test (dia 5) els animals van ser exposats a la situació test, en la què els dos recipients del grup Control contenien borumballa neta, mentre que al grup Exposit es va dipositar borumballa embrutada per mascles en un dels pots (recollida com als capítols anteriors) i borumballa neta a l'altre. Els animals romangueren en aquesta situació durant 100 minuts, transcorreguts els quals foren sacrificats i els seus cervells processats per a la immunohistoquímica de detecció del c-fos.

Durant els primers 5 minuts després de la introducció de la borumballa als pots, el comportament d'exploració dels pots dels dos grups d'animals va ser gravat en vídeo. Per l'avaluació del comportament exploratori, una persona què ignorava les condicions

experimentals, va comptar el temps que els animals passaven explorant cada estímul durant aquests 5 minuts. Es va considerar que els animals estaven explorant la borumballa estímul tot el temps que passaven sobre els recipients que la contenien.

3.2.4 Histologia i detecció immunocitoquímica de c-fos

Cent minuts després de la introducció de la borumballa, les femelles varen ser anestesiades amb sobredosi de pentobarbital sòdic (100mg/Kg) i perfoses amb solució salina, seguida de 75 ml de paraformaldehid al 4% en tampó fosfat 0.01M a un flux de 5,5 ml/min. A continuació, s'extragueren els cervells i es varen sotmetre a post-fixació en el mateix fixador, durant 4h a 4°. Posteriorment, aquests cervells van ser submergits en sacarosa en PBS al 30% fins que s'enfonsaren, per aconseguir la crioprotecció adequada, i tallats amb un micròtom de congelació (Microm HM-450, Walldorf, Alemanya), obtenint-ne seccions frontals de 40µm de gruix. Es recolliren 5 sèries paral·leles, dues de les quals varen ser conservades en tampó trizma 0.01 M amb salí isotònic (TBS, de l'anglès *Trizma Buffered Saline*) a 4° per a realitzar la immunocitoquímica de detecció del c-fos. La segona sèrie va ser muntada i tenyida amb Nissl per a ajudar a la identificació de les

estructures d'interès. La resta de les sèries varen ser congelades en sacarosa tamponada per a possibles usos posteriors.

Les seccions destinades a la detecció del c-fos varen ser incubades, en primer lloc, en aigua oxigenada (H₂O₂) al 0.01% en TBS durant 30 minuts a temperatura ambient, amb l'objectiu d'inactivar les peroxidases endògenes. A continuació, varen ser incubades de forma seqüencial en: anticòs (IgG) de conill contra la proteïna c-fos, (Laboratoris Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA) diluït 1:20.000 en TBS amb Triton X-100 al 0.3 % (Sigma, St. Louis, MO, USA) i serum de cabra normal (NGS; de l'anglès *Normal Goat Serum*, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), durant tota la nit a 4°. A continuació varen ser incubades durant dues hores a temperatura ambient en anticòs biotinitat de cabra contra immunoglobulines G de conill (Vector Laboratories), diluït 1:200 en TBS amb detergent Triton X-100 al 0.3% i NGS al 2%. Per últim, incubàrem els talls durant 90 minuts a temperatura ambient en complex peroxidasa-avidina-biotina (ABC, de l'anglès Avidin-Biotin-peroxidase Complex; Kitt Elite ABC) obtingut segons les especificacions del fabricant (Vector Laboratories) en TBS amb Tritó X-100 al 0.3%. Després de cada incubació les seccions eren llavades en TBS 2 vegades, i en gelatina al 0.2% en TB 1 vegada, en banys de 5 minuts cadascun. A continuació varen ser muntades en porta-objectes a 37°C, i assecades en estufa a 37° tota la nit.

L'activitat peroxidasa resultant va ser revelada durant 15 minuts a temperatura ambient amb 3,3'-diaminobenzidina al 0.025% (Sigma) i H₂O₂ al 0.01% en solució tamponada amb Trizma 0.05M (TB, del anglès *Trizma Buffer*) a pH 7.6.

A continuació, les seccions varen ser rentades tres vegades en gelatina al 0.2% en TB i, en porta-objectes a 37 °C, i assecades en estufa a 37°C tota la nit. Les preparacions així obtingudes foren deshidratades en alcohols, aclarides amb xilè i cobertes amb Permount.

3.2.5 Adquisició d'imatges i anàlisi de l'expressió de c-fos en les àrees d'interès.

Les estructures d'interès varen ser identificades a les preparacions de c-fos amb ajuda de les sèries paral·leles amb la tinció de Nissl. Per a la identificació dels illots de Calleja, també va resultar de gran utilitat el fet que aquests nuclis es veuen molt refringents quan són observats retirant el condensador a les pròpies preparacions de c-fos. Usant com a referència l'atles de Franklin i Paxinos (2001) del cervell del ratolí, s'identificaren a totes les preparacions idèntiques porcions dels nuclis d'estudi, caracteritzades per una determinada coordenada anteroposterior respecte de bregma (que apareix en cada imatge en negreta) i una mateixa posició relativa dins del tall. Fent servir una càmera digital (LEICA DFC300 FX) i el programa l'ADOBE

PHOTOSHOP 7.0 (Adobe Systems Inc., USA), de cada nucli captàrem una imatge per hemisferi cerebral (amb l'objectiu de 5x, excepte per als illots de Calleja, les imatges dels quals van ser captades a 10x), a les quals restàrem el fons per homogeneïtzar la il·luminació. Una vegada obtingudes les imatges, delimitàrem amb precisió l'àrea de mesura de cada nucli, seguint un criteri sistemàtic per a cadascun d'ells, que s'explicarà posteriorment. A partir d'aquest punt, el procés d'anàlisi es va realitzar fent servir l'Image J (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2008). Així, la imatge corresponent a l'àrea de mesura, convertida a escala de grisos, va ser binaritzada aplicant un nivell de llindar corresponent al 70% de la moda de l'histograma de la mateixa imatge. Per últim, es va obtenir la fracció d'àrea (àrea ocupada respecte de l'àrea total mesurada) de les partícules segmentades excloent-hi aquelles amb una àrea menor a 5 μm^2 , al cas dels illots de Calleja, i de 20 μm^2 per a la resta de nuclis. Per a cada nucli es van agrupar les dades dels dos hemisferis cerebrals per tal de tenir una sola mesura per nucli i per animal. Per comprovar que les diferències que pogueren trobar-se entre grups eren degudes a l'exposició a feromones de mascle o a borumballa neta respectivament, i que el mètode de comptatge era correcte, a banda dels citats nuclis d'interès, també analitzàrem l'expressió de c-fos al nucli geniculat lateral ventral (GLV). Aquest és

un nucli visual secundari i, per tant, la seua activació és independent d'exposició a estímuls químics.

3.2.5.1 Illots de Calleja (ICj)

Com hem explicat anteriorment, les àrees mesurades corresponents als illots de Calleja varen ser classificades en: l'illot ventromedial (ICjvm) localitzat superficialment en el cantó ventromedial de l'hemisferi cerebral rostral (nivells de Bregma 1.18-1.10 mm: Figura 25A); l'illot medial profund que correspon a l'illot magne o principal (ICjM, nivell respecte de Bregma 0.86 mm; Figura 25B); i l'illot lateral (ICjL) situat a nivells més caudal (coordenada respecte de Bregma, 0.38-0.76 mm; Figura 25C).

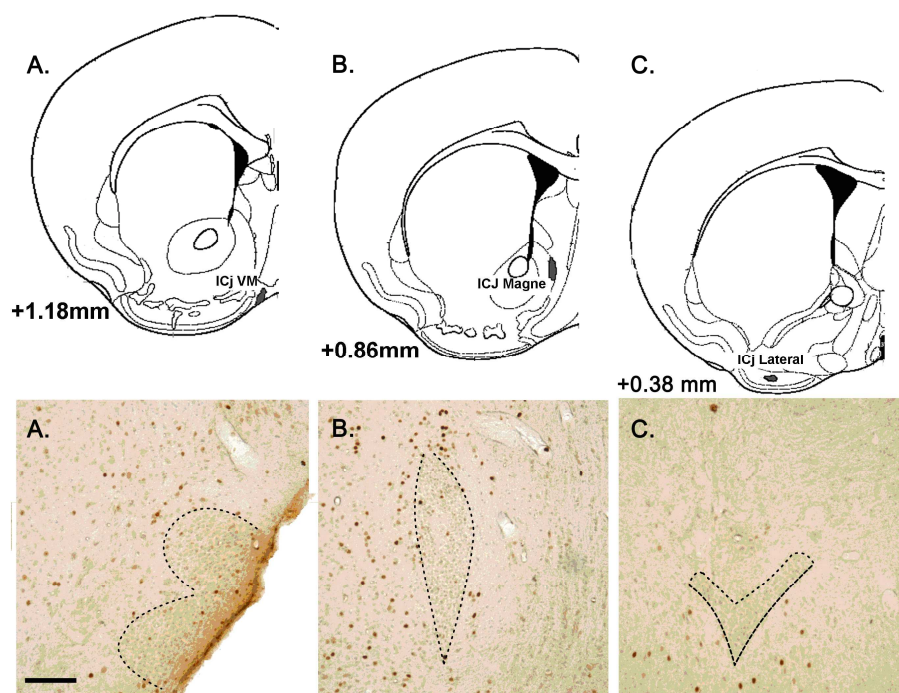


Figura 25. Illots de Calleja ventromedial (A), Magne (B) i Lateral (C) de l'hemisferi esquerre d'un dels animals exposats a borumballa embrutada per mascles intactes. Barra de calibració 100 µm.

Els illots de Calleja presenten una enorme variabilitat en grandària i forma, fins i tot a nivells anteroposteriors similars, la qual cosa dificulta definir una àrea de mesura de dimensions i/o forma fixes que siga comparable entre els diferents casos. Per aquesta raó es va decidir prendre com a àrea de mesura el total de la superfície ocupada per cadascun dels illots, més un 20% d'aquesta àrea, assumint que l'hipotètic increment en l'expressió de c-fos induït per les feromones reforçants, també podria activar les cèl·lules del voltant dels illots, amb les què podrien estar funcionalment relacionats (Figura 26A). Així, una vegada captades cadascuna de les imatges i restat el fons, es va delimitar tota la superfície ocupada per l'illot en qüestió mitjançant un rectangle. La imatge analitzada era la resultant d'eixamplar el rectangle un 20% en direcció lateral, és a dir, cap al nucli accumbens.

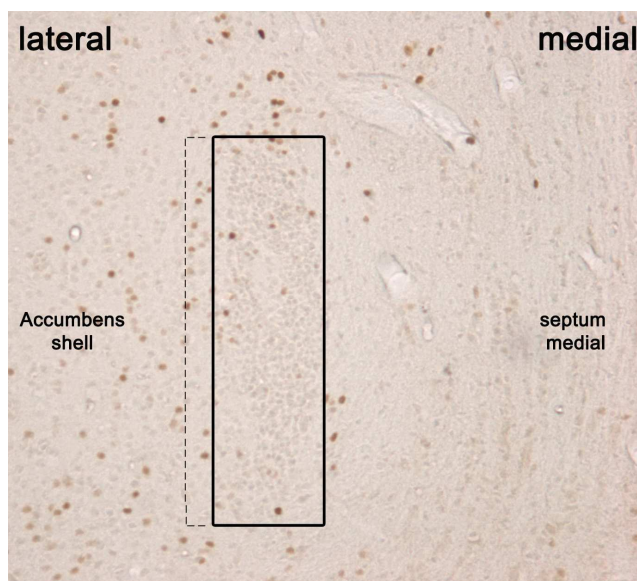


Figura 26. Illot de Calleja Magne sobre el què s'ha representat l'àrea que aquest ocupa (dins el rectangle de línia contínua) i l'àrea extra a la què també s'ha mesurat la fracció d'àrea que ocupen els nuclis activats (un 20% de l'àrea que ocupa l'illot; representat amb línies discontinúes).

3.2.5.2 Nucli posteromedial cortical de l'Amígdala (CoApm)

Donat que, en el ratolí, aquesta és una estructura molt gran en la seua dimensió anteroposterior se va analitzar l'expressió de c-fos a dos nivells anteroposteriors, un situat en la coordenada anteroposterior de -3.16 mm (anterior; Figura 27) i l'altre a -2.18 mm (posterior; Figura 28).

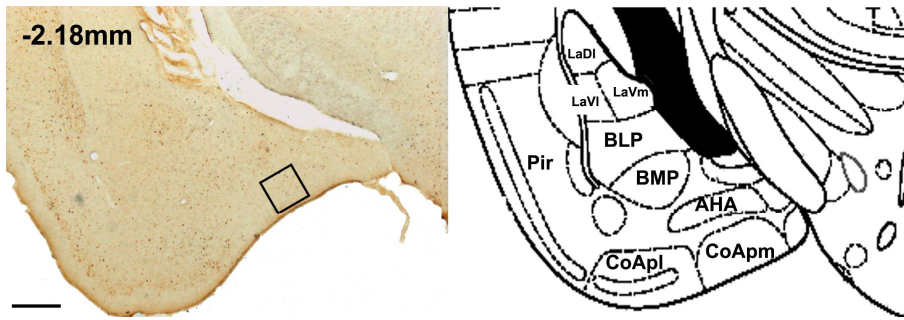


Figura 27. Imatge a baix augment d'un tall de l'amígdala esquerra d'un dels animals exposats a borumballa embrutada per mascles intactes, processat per la immunohistoquímica de c-fos (esquerra, inclou un requadre indica la localització de l'àrea de mesura del CoApm anterior). A la dreta es mostra un esquema del nivell corresponent de l'atles de Paxinos i Franklin (2003). Barra de calibració 200 μ m.

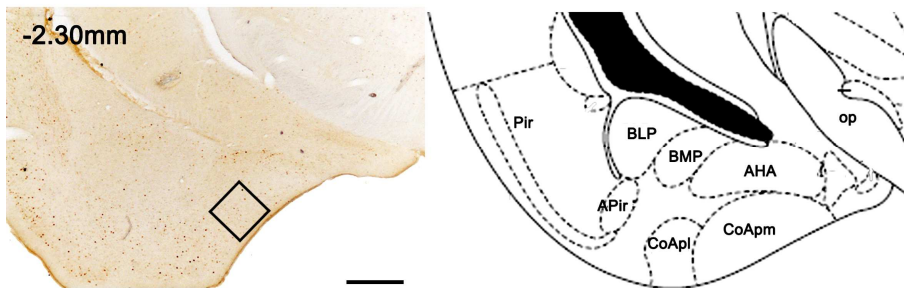


Figura 28. Localització del requadre de mesura del CoApm posterior en l'hemisferi esquerre d'un dels animals exposats a borumballa embrutada per mascles intactes (esquerra) i a l'esquema de l'atles de Paxinos i Franklin del nivell corresponent (dreta). Barra de calibració 200 μ m.

A ambdós nivells es va prendre una àrea de mesura de 300 x 300 μ m, a cada hemisferi, orientada de forma que un dels seus costats fora paral·lel a la superfície pial.

3.2.5.3 Àrea Amígdalo-Hipocàmpica (AHA)

Les imatges d'aquest nucli varen ser captades aproximadament al nivell anteroposterior -2.30 mm. En cada secció analitzada es va analitzar una àrea de 200 x 300 µm a cada hemisferi (Figura 29).

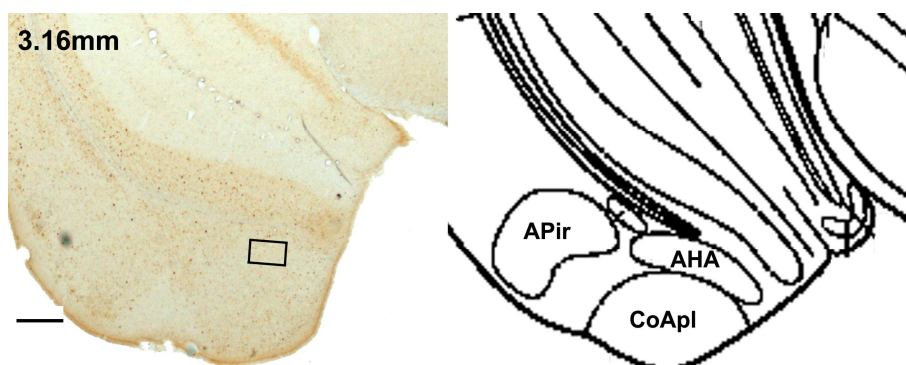


Figura 29. Tall representatiu del nivell al què s'ha mesurat l'expressió de la proteïna c-fos a l'AHA (esquerra, inclou un requadre indica la localització de l'àrea de mesura del CoApm anterior) junt a un esquema del nivell equivalent de l'atles (dreta). Abreviatures: AHA: àrea amígdalo-hipocàmpica; APir: àrea de transició amígdalo-piriforme; BLP: nucli basolateral de l'amígdala; part posterior BMP: nucli basomedial de l'amígdala, part posterior; CoApm: amígdala cortical, part posteromedial; CoApl: amígdala cortical, part posterolateral; op: tracte òptic (de l'anglès optic tract); Pir; escorça piriforme. Barra de calibració 200µm.

3.2.5.4 Nucli Geniculat Lateral Ventral (GLV)

D'aquest nucli es van captar imatges de tots dos costats del tàlem al nivell anteroposterior -2.30 mm respecte de Bregma (Figura 30). Per l'anàlisi de la immunoreactivitat de c-fos es va delimitar una àrea de mesura rectangular de dimensions 160 x 300 µm amb el costat menor paral·lel al tracte òptic.

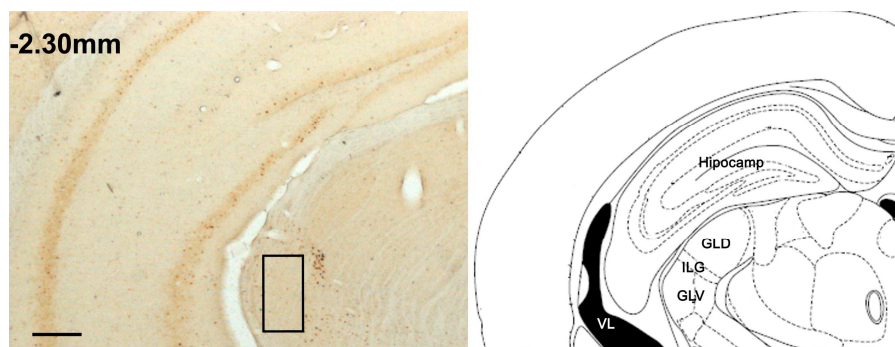


Figura 30. Tall (esquerra, inclou un requadre indica la localització de l'àrea de mesura del CoApm anterior) i esquema (dreta) representatiu del nivell al que s'ha mesurat l'expressió de la proteïna c-fos al GLV. Abreviatures: GLD: nucli geniculat lateral dorsal; ILG: fulla intergeniculada; GLV: nucli geniculat ventral. Barra de calibració 200µm.

3.2.6 Anàlisi de les dades

Per l'anàlisi estadística de les dades utilitzarem el software lliure R (Development Core Team ; 2008. Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.)

En primer lloc compararem si hi havia diferència en l'expressió de c-fos entre els grup Control i Exposit al GLV, per a la qual cosa compararem les mitjanes dels dos grups fent servir una ANOVA d'un factor, després de comprovar que les dades seguien una distribució normal mitjançant un test de Kolmogorov-Smirnov (i aplicant la correcció de Lillieford).

A continuació, procedirem a analitzar l'activació dels illots de Calleja, el CoApm i l'AHA. De l'anàlisi de les imatges obtindrem dos

conjunts de dades (un per grup) per cada nucli estudiat. Mitjançant la comparació dels mateixos es pot contrastar la hipòtesi nul·la que les mitjanes de les distribucions que les han generades són iguals. L'opció més habitual en aquest cas sol ser el test de la *t* de Student, ja siga assumint *variances* comunes o distintes. Aquest test és vàlid per a mostres grans, però quan les grandàries mostrals són menudes (com és el nostre cas; $n=6$ per grup) la *t* de Student no és tan fiable (Good, 1994; Mainly, 1997).

Per aquesta raó es va considerar convenient la utilització d'un test alternatiu per contrastar la hipòtesi nul·la, el test d'aleatorització (Good-Philip, 2005). Utilitzant una de les funcions del software R, es va assignar aleatòriament les dades a dos grups de 6 dades cadascú, fent així totes les possibles combinacions amb les 12 mesures, agrupades de 6 en 6. A partir d'aquestes agrupacions aleatòries de les dades (incloent-hi la observada realment) es va calcular els estadístics *t* (de la *t* de Student) corresponents, que anomenem t_1 (derivat dels valors observats a les dades originals) i t_2, \dots, t_s derivats de les successives agrupacions aleatòries. D'acord amb la hipòtesi nul·la, tots dos conjunts de dades son mostres d'una mateixa distribució, i per tant qualsevol possible ordenació ha de ser equiprobable. Aquesta sèrie de dades generades ens permeten, per tant, no solament comparar les mitjanes, sinó la distribució de les dades.

Suposem que r_1 és la posició que ocupa t_1 entre t_1, \dots, t_s , aleshores el p-valor seria:

$$2 * r_1 / s, \text{ si } 2 * r_1 < s$$

ó bé $2 * (1 - r_1 / 2)$ en l'altre cas.

Seguint aquest mètode compararem la densitat d'àrea entre els grups control i exposat a cada nucli.

A continuació d'aquestes anàlisis es van estudiar les possibles correlacions entre l'expressió de c-fos i les dades de comportament d'exploració de les feromones de mascle al test d'elecció simple explicat anteriorment. En aquest cas, com que la variable comportament no seguia una distribució normal, es va analitzar el coeficient de correlació Rho d'Spearman, que és no paramètric.

Per últim, es va analitzar la possible correlació entre l'expressió de c-fos al grup Exposat i al grup Control entre els diferents nuclis per a la qual cosa es va calcular el coeficient de correlació de Pearson (paramètric) donat que en aquest cas totes les variables eren normals.

3.3. RESULTATS

3.3.1 Proves de Comportament

Com ja va ser publicat prèviament amb les mateixes dades (Moncho-Bogani et al., 2005), els animals del grup control a penes exploraren els pots amb borumballa neta durant els 5 minuts enregistrats, i no mostraren preferència per cap dels costats. Pel contrari, els animals del grup Exposit mostraren una clara preferència, estadísticament significativa, per explorar la borumballa embrutada per mascles front a la borumballa neta (Figura 31).

3.3.2 Anàlisi de l'expressió de c-fos

La immunohistoquímica de c-fos mostrava nuclis cel·lulars marcats total o parcialment, en general de forma esfèrica i de dimensions diferents en funció de les estructures (Figura 32).

Pel que fa als illots de Calleja, d'acord amb la descripció de Fallon i col·laboradors (1978) estan formats per una elevada densitat de cèl·lules granulars que probablement son interneurons, junt a les quals s'hi troben unes poques cèl·lules de mida mitjana o gran, considerades les neurones de projecció. Una observació detallada de les preparacions de c-fos revela que les neurones granulars rara vegada expressen c-fos, sent atribuïble, per tant, la major part de la

reactivitat observada, a les neurones de projecció (Figura 33) o neurones veïnes a l'illot.

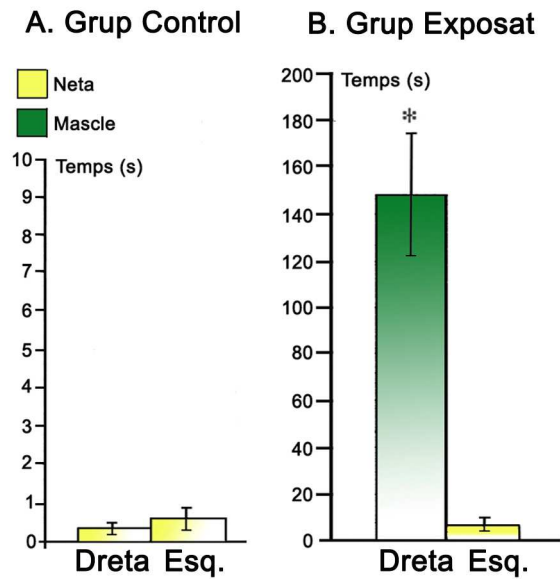


Figura 31. Histograma de barres que representa el temps de quimioinvestigació (mitjana \pm SEM) de les femelles del grup Control (A) i Exposat (B) a un test de preferència al què les femelles control tingueren accés a borumballa neta als dos pots, mentre que les del grup Exposat trobaren borumballa neta a un d'ells i embrutada per mascles a l'altre. Les femelles del grup Control no preferiren cap dels dos pots, mentre que les del grup Exposat investigaren significativament més temps el pot de borumballa embrutada per mascles (* $p < 0.05$).

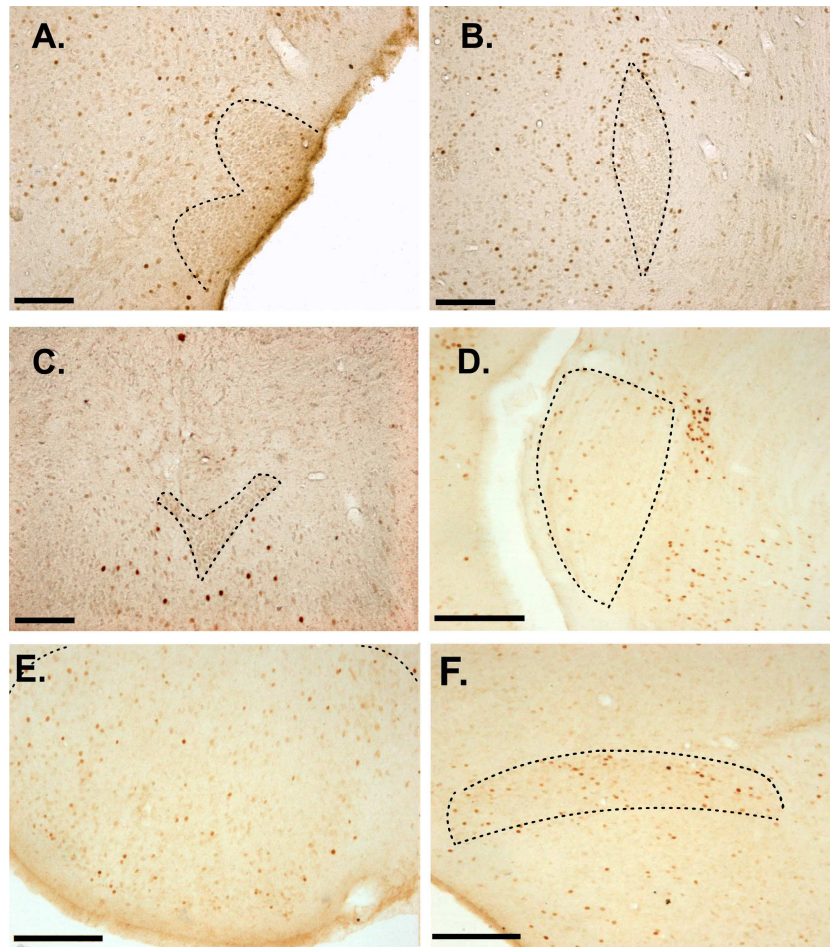


Figura 32. Immunoreactivitat c-fos als diferents nuclis estudiats. Com es pot apreciar, la immunoreactivitat es localitza als nuclis cel·lulars que solen tindre morfologia esfèrica, i diferent tamany segons l'estructura concreta. Barra de calibració: 200 μ m. A: ICj VM, B: ICj Magne, C: ICj Lateral, D: GLV, E: CoApm anterior (el posterior no l'hem representat perquè la morfologia i la grandària dels nuclis és molt similar a la del CoApm anterior), F: AHA.

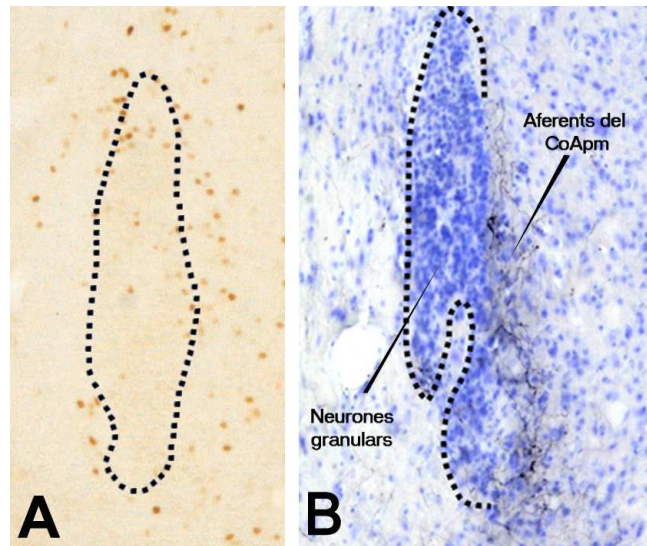


Figura 33. Detall a major augment de la immunoreactivitat c.fos a l'illot de Calleja principal (A) junt a una imatge, als mateixos augments, de l'aspecte de la mateixa estructura amb una tinció de Nissl (B), en un animal que rebé una injecció d'un traçador anterògrad al CoApm (imatge cedida per Amparo Novejarque), Les cèl·lules immunoreactives als animals que han explorat feromones sexuals de mascle semblen pertànyer majoritàriament a neurones de projecció, i no a les cèl·lules granulars.

3.3.2.1 Anàlisi de l'expressió de c-fos al GLV

Com hem explicat anteriorment, l'activació d'aquest nucli del sistema visual no hauria de veure's influenciada per l'exposició a feromones masculines, per la qual cosa esperàvem que el resultat d'aquesta anàlisi fora l'absència de diferències entre grups.

Les mitjanes de l'expressió de c-fos dels grup Exposat i Control al GLV, es van comparar amb una ANOVA d'un factor (**Grup**, Exposat i Control), després de comprovar que les dades seguien una

distribució normal mitjançant un test de Kolmogorov-Smirnov (aplicant la correcció de Lillieford).

Malgrat que els resultats de l'ANOVA no arriben a mostrar diferències significatives entre grups ($F_{1,10}=3.570$, $p=0.088$), si semblen indicar una tendència a que l'expressió de c-fos al grup Control siga major que al grup Exposit (el què s'aprecia si observem el gràfic que il·lustra els resultats; Figura 34).

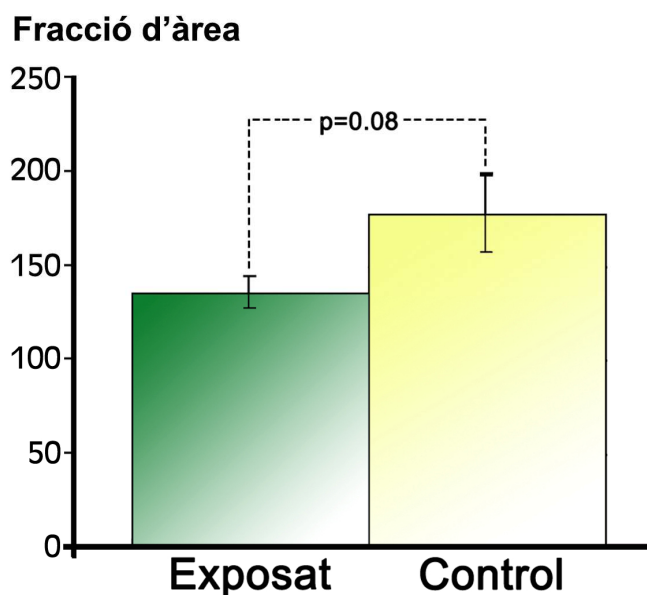


Figura 34. Expressió de c-fos (mitjana ± SEM) al GLV, als grups Exposit i Control. Les mitjanes dels dos grups no arriben a ser significativament diferents, però s'observa una tendència a una expressió major al grup control.

Donat que les condicions d'il·luminació dels animals dels dos grups eren les mateixes, i els tests es dugueren a terme a la mateixa hora del dia, aquesta tendència cap a una diferència entre els grups en un

centre visual secundari sembla atribuïble a una major activació global dels animals del grup control, front als del grup exposat, que podria influir també a les dades de les àrees d'interès (illots de Calleja, CoApm i AHA). Així doncs, per tal d'evitar que aquest fet introduïra un biaix en les dades, per al càlcul de l'activitat c-fos en aquests nuclis generarem una nova variable per animal i nucli d'interès restant a la fracció d'àrea resultant de l'expressió de c-fos de cada nucli el valor al GLV del mateix animal. Aquesta nova variable va ser utilitzada per totes les anàlisis que es descriuen a continuació, tant per l'estadístic t obtingut per aleatorització com pels estudis de correlació posteriors.

3.3.2.2. Anàlisi de l'expressió de c-fos al CoApm

Com hem explicat anteriorment, l'estudi de l'activació del CoApm front a la detecció de feromones masculines es va fer a dos nivells anteroposteriors, a -3.16 mm i a -2.18 mm, respectivament, les dades dels quals es van agrupar per obtenir una sola mesura per animal.

L'anàlisi de l'estadístic t mitjançant aleatorització mostrarà que l'activació del CoApm és major al grup Exposat que al Control (Figura 35), el que indica que el CoApm està implicat en la detecció de feromones de mascle, ja que les seues neurones s'activen en resposta a l'exposició a borumballa.

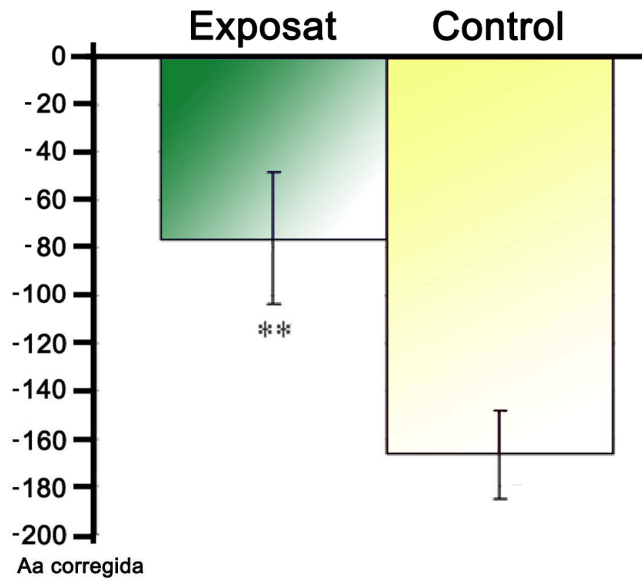


Figura 35. Expressió de c-fos (mitjana ± SEM) al CoApm amb les dades agrupades dels dos nivells, expressada en forma de la fracció d'àrea corregida (Aa corregida) respecte del GLV (veure text), el que explica els valors negatius. L'estadístic t mitjançant aleatorització revela que l'expressió és significativament major al grup exposat.

3.3.2.3 Anàlisi de l'expressió de c-fos a l'AHA

L'expressió de c-fos a l'AHA dels grups Exposat i Control va ser comparada mitjançant una t d'Student seguint el procediment explicat abans. Aquesta anàlisi va indicar que al grup Exposat es donava una activació de l'AHA significativament més alta que al grup Control ($p < 0.001$; Figura 36).

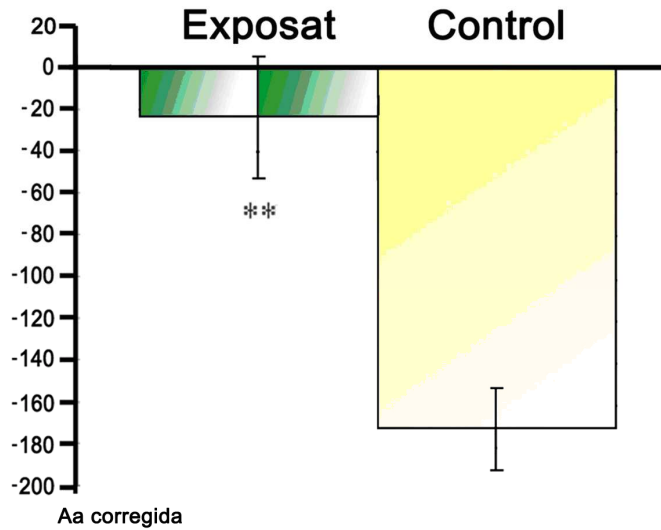


Figura 36. Expressió de c-fos (mitjana ± SEM) a l'AHA normalitzades respecte del GLV (fracció d'àrea corregida, Aa). L'estadístic t mitjançant aleatorització revela que l'expressió és significativament major al grup exposat. Els asteriscos indiquen els distints nivells de significació a l'ANOVA, de manera que * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, + indica p-valor aproximadament igual a 0.05).

És a dir, l'AHA també forma part del circuit implicat en la detecció senyals químics continguts a la borumballa embrutada per mascles.

3.3.2.4 Anàlisi de l'expressió de c-fos als Illots de Calleja

Com ja hem explicat anteriorment, en aquest treball hem estudiat els illots de Calleja dividint-los en tres categories: medials ventrals (ICjvm), l'illot Magne (medial profund; ICjM) i els illots laterals (ICjL). L'activació de l'ICjvm com a conseqüència de l'exposició a feromones

sexuals de mascle va ser analitzada calculant l'estadístic t mitjançant aleatorització, comparant la fracció d'àrea normalitzada respecte del GLV entre el grup Control i el grup Exposit. Aquesta anàlisi mostra una immunoreactivitat significativament superior al grup Exposit que al Control ($p < 0.001$; Figura 37A).

En canvi quan aquesta anàlisi es va fer per a l'ICjM, no aparegueren diferències significatives entre l'expressió de c-fos als grups Exposit i Control ($p = 0.28$; Figura 37B) el què sembla indicar que l'ICj Magne no seria activat per les feromones sexuals de mascle contingudes en la borumballa.

D'altra banda, l'estadístic t comparant la fracció d'àrea del marcatge a l'ICjL entre els grups Control i Exposit assenyala una tendència a que els illots laterals s'activen quan els animals són exposats a borumballa de mascle, però la diferència entre els dos grups tot just arriba a ser significativa ($p = 0.05$; Figura 37C).

A. ICj Ventromedials B. ICj Magne C. ICj Laterals

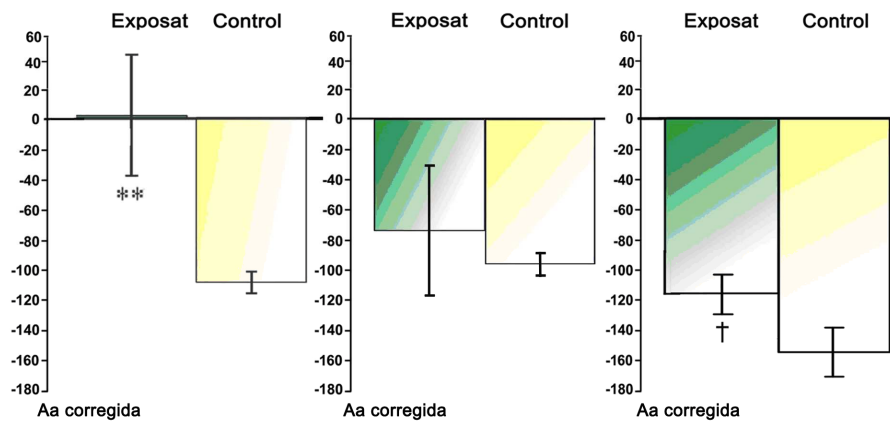


Figura 37. Expressió de c-fos (mitjana ± SEM) als illots de Calleja Ventromedials (A), Magne (B) i laterals (C), amb les dades normalitzades respecte del GLV (fracció d'àrea corregida, Aa). L'estadístic t mitjançant aleatorització revela que als illots de Calleja Ventromedials l'expressió és significativament major al grup exposat, mentre que a l'illot Magne no hi han diferències significatives i als illots laterals l'expressió és gairebé significativament major al grup Exposat que al Control. Els asteriscos indiquen els distints nivells de significació: ** p <0.001; † p=0.05).

Com a conclusió podem dir que no tots els illots s'activen de la mateixa manera com a conseqüència de l'exposició a borumballa de mascle. Així, els illots ventromedials i, en certa mesura, els laterals són activats per l'exploració de feromones masculines, mentre que l'ICj Magne no ho és.

3.3.3. Estudis de correlació

3.3.3.1 Correlació entre expressió de c-fos i temps d'exploració de feromones masculines

Un anàlisi molt interessant per seguir indagant sobre la implicació de les àrees del cervell en la detecció de les feromones sexuals de mascle, és estudiar si l'activació d'aquests nuclis està correlacionada amb el comportament d'exploració de les feromones. És a dir, si com més temps exploren les femelles les feromones de mascle, major és l'activació d'aquests nuclis o àrees cerebrals.

Per a la qual cosa, en aquest apartat estudiem les correlacions entre el temps d'exploració de la borumballa de mascle al test d'elecció simple amb l'expressió de c-fos. És a dir, analitzarem la correlació entre les variable *temps d'exploració de la feromona (TEMPS)*, i *fracció d'àrea* (expressió de c-fos). En aquesta anàlisi podem incloure no sols els 6 animals del grup exposat, sinó també els 6 del grup control, als quals assignarem un valor 0 a la variable *temps d'exploració de la feromona*, donat que cap d'ells havia explorat feromones masculines. Tot i que d'aquesta manera la grandària mostral s'incrementa, la variable TEMPS esdevé no normal. Per aquest motiu, haguérem de recórrer a tests no paramètrics (en concret a la Rho d'Spearman), per a fer les anàlisis de correlació.

A continuació es mostra una taula resum (Taula 1) dels coeficients de correlació entre ICjvm, ICjM, ICjL, AHA i CoApm amb el temps d'exploració de la feromona al test d'elecció simple.

nucli	coeficient correlació	p-valor
Icj VM	0,705*	0,01
Icj Magne	0,351	0,264
Icj Lateral	0,444	0,148
AHA	0,851**	0,001
CoApm	0,75*	0,005

Taula 1. Correlacions entre el temps d'exploració de la feromona masculina i la fracció d'àrea a cadascun dels nuclis estudiats. Els asteriscos indiquen els distints nivells de significació, que també s'indiquen a la part inferior de la taula. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Aquestes dades indiquen que al CoApm, a l'AHA l' i al ICjvm, nuclis als què la t de Student havia mostrat una densitat d'àrea major al grup Exposit que al grup Control, l'activació està clarament correlacionada amb l'exploració de la borumballa embrutada per mascles. Açò confirma que aquestes àrees poden formar part del circuit que mitjança el reforç induït per les feromones sexuals de mascle.

En canvi, ni l'expressió de c-fos a l'ICjM ni a l'ICjL està correlacionada amb l'exploració de la borumballa.

3.3.3.2. Correlació de l'expressió de c-fos entre diverses estructures

L'anàlisi indica que a alguns nuclis l'activació de l'expressió de c-fos està correlacionada amb el temps d'exploració de les feromones sexuals de mascle (els illots de Calleja ventromedials, el CoApm i l'AHA), mentre que a d'altres no ho està (illots de Calleja laterals i Magne). A continuació resulta interessant estudiar si l'activitat de tots aquests nuclis està correlacionada entre sí o no. Amb aquest objectiu en aquest punt estudiem les correlacions entre l'expressió de c-fos a cadascun dels nuclis estudiats. Com que en aquest cas les variables eren normals, es va calcular el coeficient de correlació de Pearson, que permet una anàlisi més potent. A continuació es mostra una taula resum (Taula 2) d'aquest coeficient i la seua significació.

		ICJ vm	ICj Lateral	ICj Magne	CoApm	AHA
ICj vm	Coefficient correlació		0,49	0,713**	0,85**	0,775**
	p valor		0,1	<0,001	<0,001	0,003
ICj Lateral	Coefficient correlació	0,49		0,441	0,629*	0,814**
	p valor	0,1		0,151	0,028	0,001
ICj Magne	Coefficient correlació	0,713**	0,441		0,622*	0,568
	p valor	<0,001	0,151		0,031	0,054
CoApm	Coefficient correlació	0,85**	0,629*	0,622*		0,814*
	p valor	<0,001	0,028	0,031		0,001
AHA	Coefficient correlació	0,775**	0,814**	0,568	0,814*	
	p valor	0,003	0,001	0,054	0,001	

Taula 2. Anàlisi de les correlacions entre la densitat d'àrea de la immunoreactivitat c-fos dels diferents nuclis estudiats.

En primer lloc, aquestes dades indiquen que l'activitat c-fos dels illots de Calleja ventromedials, el CoApm i l'AHA, els nuclis que són activats per l'exposició a feromona de mascle, i als què, a més, aquesta activació es correlaciona amb el temps d'exploració de les feromones, està correlacionada. A més, i donat que aquestes tres estructures es troben connectades a través de la via vomeronasal descrita per Novejarque (2007/08) i Ubeda-Bañón et al. (2008), aquests resultats semblen indicar que el CoApm i l'AHA, junt amb l'illot de Calleja ventromedial podrien constituir part del sistema implicat en la detecció de les feromones reforçants.

Per últim, l'activitat dels illots de Calleja laterals està correlacionada amb la del CoApm i l'AHA, però no amb l'activitat dels illots més medials.

3.4. DISCUSSIÓ

Els resultats dels capítols anteriors demostren l'existència en ratolí de feromones sexuals masculines que són detectades per l'òrgan vomeronasal de les femelles i que tenen propietats reforçants per a aquestes.

En aquest tercer capítol ens hem proposat explorar quina seria la ruta anatòmica a través de la qual es processen aquests senyals i que podria ser responsable de codificar el seu valor reforçant. Amb aquest objectiu hem estudiat, en primer lloc, l'activació (expressió de c-fos) dels illots de Calleja Ventromedial, Magne i Lateral (ICjvm, ICjM i ICjL), de l'amígdala cortical posteromedial (CoApm) i de l'àrea amígdalo-hipocàmpica (AHA) de les femelles de ratolí en resposta a la detecció de les feromones sexuals de mascle, mitjançant les anàlisis de fracció d'àrea marcada abans explicades. Aquesta anàlisi ens permet comprovar si aquestes àrees estan implicades en el processat del valor reforçant de les feromones sexuals de mascle. En segon lloc, hem analitzat les correlacions entre l'activació (l'expressió de c-fos) dels nuclis estudiats, amb el temps que els animals han estat exposats a les feromones durant els tests d'elecció simple (Moncho-Bogani et al., 2005). Aquesta segona anàlisi ens permet confirmar si l'activació de les cèl·lules d'aquestes àrees està associada, efectivament, a la detecció de les feromones sexuals de mascle.

3.4.1. Consideracions metodològiques

La utilització d'un nucli control és una mesura comú en aquesta mena d'estudis. Normalment es fa servir un nucli no relacionat amb el sistema funcional estudiat i no influït, per tant, per l'estímul o la expressió comportamental objecte de l'estudi. En el nostre cas usarem el GLV que, en ser un centre visual secundari, hauria de servir com a control donat que els tests dels animals de tots dos grups foren duts a terme en similars condicions d'il·luminació i a la mateixa hora del dia. Per aqueix motiu, els resultats ens sorprengueren en revelar una clara tendència (tot i que no significativa) cap a una major fracció d'àrea de la immunoreactivitat c-fos al grup control que al exposat. Altres autors (Wan et al., 2001) interpreten aquests resultats com indicadors d'una certa activació general (inespecífica) del grup control, i compensen el biaix que aquesta podria introduir en la mesura de la immunoreactivitat en els nuclis objecte de l'estudi, restant a la mesura de c-fos dels mateixos la del nucli control al mateix animal. Nosaltres hem seguit aquesta estratègia i, és per això, que la mesura de l'activitat de cada nucli ha sigut obtinguda restant a la fracció d'àrea observada al mateix la observada en el GLV del mateix animal, el que anomenem fracció d'àrea normalitzada o corregida respecte de GLV.

3.4.2. El còrtex vomeronasal es activat per les feromones masculines

Les nostres dades indiquen que la exploració de borumballa embrutada per mascles resulta en una activació del CoApm i de l'AHA observada en un increment significatiu de l'expressió del proto-oncogen c-fos respecte del grup control. A més, aquesta expressió es correlaciona amb el temps d'exploració de les feromones de mascle al test d'elecció simple. Així doncs, els nostres resultats confirmen el paper del CoApm en la detecció de les feromones sexuals de mascle (i probablement, en la senyalització del seu valor reforçant, veure baix), en clara coincidència amb els resultats de Moncho-Bogani et al., (2005) utilitzant la mateixa tècnica, malgrat que en aquest treball no es va estudiar l'AHA.

D'altra banda, aquestes dades coincideixen plenament amb els resultats del capítol 1 d'aquesta tesi, d'acord amb els quals, les feromones masculines són estímuls vomeronasals. De fet, és ben sabut, que el BOA (receptor dels axons de l'òrgan vomeronasal) projecta, fonamentalment, al nucli posteromedial de l'amígdala cortical (CoApm; Broadwell, 1975; Scalia i Winans, 1975). D'altra banda, malgrat no rebre projecció vomeronasal directa, l'àrea amígdalo-hipocàmica (AHA) rep projeccions de l'amígdala medial (MeA; Gomez and Newman, 1992 i Canteras et al., 1995; Martinez-

Garcia et al., 2008) i del BSTpm (Scalia i Winnans 1970; Ubeda-Bañon et al., 2008, von Campenhausen i Mori, 2002; Dong i Swanson, 2004) i, per tant, ha de considerar-se un nucli vomeronasal terciari. A més, malgrat que les projeccions entre CoApm i AHA no estan ben estudiades, és possible que existisquen connexions entre les dues estructures (Gutierrez-Castellanos et al., 2008). És per això que hom considera que el CoApm i l'AHA, conjuntament, formen el cortex vomeronasal dels mamífers (Martínez-García et al., 2007; 2008). Això justifica l'afirmació, basada en els nostres resultats, que als ratolins les feromones masculines activen l'escorça vomeronasal.

A més, hi ha dades experimentals que suggereixen que aquesta activació està relacionada amb l'atracció de les femelles cap a les feromones sexuals dels mascles. Així, Romero et al., (1990) observaren que les lesions del COApm a femelles de rata eliminen el que ells anomenen androtropisme, és a dir, la preferència mostrada per les femelles de passar més temps prop d'un mascle intacte engabiat que d'un mascle castrat engabiat. Tot i que en aquesta situació experimental l'androtropisme podria ser degut a altres estímuls (visual o auditius, p.e. vocalitzacions), les nostres dades suggereixen que són les feromones no volàtils les principals responsables i que, segurament, les gàbies de Romero et al (1990)

permetien el contacte entre mascle i femella i, amb això, l'accés de les feromones a l'òrgan vomeronasal.

3.4.3 Els illots de Calleja medials són part de l'estriat vomeronasal

Com ja hem explicat anteriorment, per a l'estudi del illots de Calleja hem classificat aquests en tres categories: medial i ventral (ICj ventromedial), medial i profund (ICj magne), i lateral i caudal (ICj lateral).

La comparació dels nivells d'expressió de c-fos entre els grups control i exposat fent servir l'estadístic t calculat mitjançant aleatorització revelaren que els illots de Calleja que s'activen de manera específica com a resposta a la detecció de feromones sexuals de mascle són els que hem classificat com ventromedials (ICj VM), mentre que l'ICjM no sembla activar-se per l'exploració d'aquests senyals, i els laterals semblen respondre en menor mesura.

Per tant, podem concloure que els illots de Calleja, tot i formar una estructura anatòmicament contínua (de Vente et al., 2001), mostren una clara heterogeneïtat funcional. De tots ells, sols a l'ICjvm s'observa clarament una major activitat al grup exposat que al control, i aquesta activitat c-fos està correlacionada amb el comportament exploratori de la borumballa de mascle. Això suggereix que aquesta porció dels ICj forma part del circuit cerebral

implicat en la detecció de feromones sexuals masculines, la qual cosa ve confirmada per la correlació entre l'expressió de c-fos al ICjvm i el còrtex vomeronasal.

Aquests resultats encaixen amb les dades de traçat de connexions tant del nostre grup com d'altres. S'ha vist que els illots de Calleja reben *inputs* molt importants des d'àrees vomeronasals, com són el CoApm i l'AHA (Novejarque 2007/2008; Ubeda-Bañón et al., 2008) i que aquestes projeccions arribarien de manera concreta als illots més medials (ICjM i ICjvm).

En aquest sentit, les nostres dades d'expressió de c-fos són coherents amb les dades del traçat neuroanatòmic parcialment, doncs que l'illot de Calleja Magne no sembla activar-se quan els animals són exposats a borumballa embrutada per mascles als nostres experiments mentre que tant el treball de Novejarque (2007/2008) en ratolí com el de Ubeda-Bañón i col·laboradors (2008) en rata, mostren que el CoApm projecta a l'ICj Magne. Una possibilitat que podria explicar els nostres resultats és que l'àrea a la què hem mesurat l'expressió de c-fos a l'illot de Calleja Magne no compreguera la regió què rep les aferències des del CoApm, de manera que no haguérem mesurat l'activació les cèl·lules que teòricament s'activarien com a conseqüència de l'estimulació vomeronasal.

Les dades anatòmiques disponibles ens permeten descartar aquesta possibilitat. Els illots de Calleja (Figura 38) estan formats majoritàriament per neurones granulars, probablement GABAèrgiques (Krieger et al., 1983), molt densament agrupades en una estructura en forma de copa. Al centre d'aquesta copa hi ha neuropil al què s'hi situen el somes i la major part de l'arbre dendrític de les cèl·lules mitjanes i grans, de naturalesa colinèrgica (Fallon et al., 1983) que representen les cèl·lules eferents dels illots. Les projeccions de l'amígdala vomeronasal acaben al neuropil on es troben les dendrites de les neurones de projecció (Fallon et al., 1978), mentre que altres regions de l'amígdala (l'amígdala basolateral) semblen innervar les neurones granulars (Fallon et al., 1978; Novejarque 2007/08). Donat el procediment que hem seguit per delimitar l'àrea de mesura de l'ICj Magne, segons el qual hem pres com a amplitud de cada illot la màxima que aquest presenta i, a més, l'hem incrementada un 20% en la direcció en la què les dades anatòmiques ens indiquen que arriben els terminals amigdalins (Figura 38C) és molt improbable que no haguem comprès la porció receptora de les aferències des del CoApm, i en qualsevol cas hem inclòs la regió on es troben les neurones de projecció.

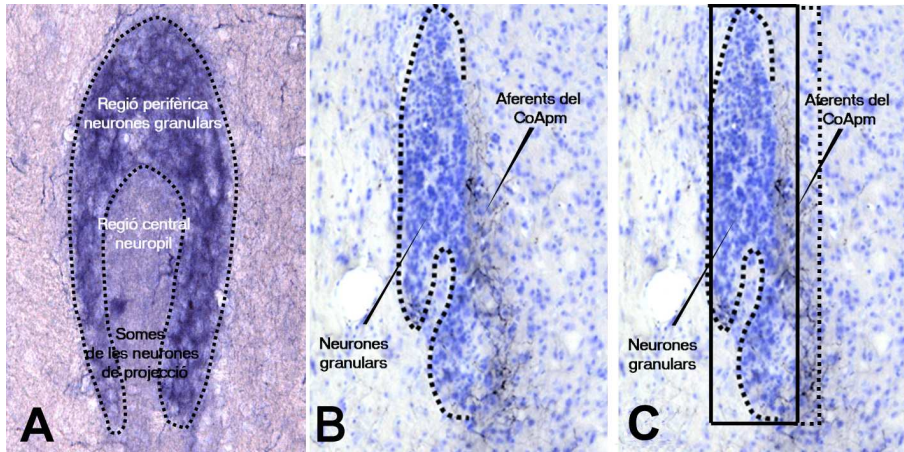


Figura 38. Citoarquitectònia dels illots de Calleja. A. Histoquímica de l'activitat NADPH diaforasa a l'illot de Calleja Magne, a la què s'observen la regió perifèrica i la central, que conté el neuropil i al què es troben les neurones de projecció. B. Tinció de Nissl de l'illot de Calleja Magne a la què s'observen les fibres marcades anterògradament en la regió del neuropil després de la injecció d'un traçador neuroanatòmic al CoApm. Imatges cedides per Carmen Agustín-Pavón (A) i Amparo Novejarque (B). L'àrea a la què mesuravem la fracció d'àrea a l'ICj Magne era la longitud de l'illot multiplicada per l'amplària (rectangle de línies contínues) incrementant un 20% l'amplària en la direcció en què les dades anatòmiques indiquen que arriben els terminals amigdalins. Açò dona lloc a un rectangle de mesura (línies discontinúes) que inclou les neurones que reben la projecció amigdalina (C).

Per tant, cal buscar hipòtesis alternatives que expliquen perquè l'ICj Magne no s'activa front a l'exposició a borumballa embrutada per mascles. Una possible explicació, podria ser que, dins l'*estriat vomeronasal*, hi haguera una certa especialització d'acord amb la

qual diferents estímuls vomeronasals (feromones sexuals, feromones d'alarma, al·lomones, és a dir senyals químiques d'altres espècies), activaren diferents compartiments de l'estriat. D'acord amb aquesta hipòtesis i amb les nostres dades, l'ICjM podria estar implicat en la elaboració de respostes afectives a feromones no sexuals o a al·lomones, però no a feromones sexuals.

En aquest sentit, l'illot Magne ocupa una posició peculiar que el fa diferent de la resta dels ICj. No és adjacent al Tu ni els anomenats ponts cel·lulars de l'estriat ventral (CB, de l'anglès *Cell Bridges*) i pot ser aquesta peculiaritat estiga relacionada amb la seua singularitat funcional.

3.4.5 Els illots de Calleja laterals: possible substrat de les respostes afectives a olors

Les dades relatives als ICj laterals semblen d'entrada contradictoris. Així, mentre la comparació entre els grups Exposat i Control revela una expressió significativament major de c-fos en el grup Exposat, no hi ha correlació entre aquesta activació i el temps que els animals exploraren la borumballa embrutada per mascles. Una possible explicació per aquestes dades seria que els ICjL foren activats per les olors (volàtils), en lloc de ser-ho per les feromones vomeronasals no volàtils. Si així fora cabria esperar que, com indiquen les nostres dades, que al grup exposat els nivells d'expressió de c-fos foren

major que al grup control, donat que la borumballa de mascle conté nombrosos volàtils (estímuls olfactius) detectables fins i tot per l'olfacte humà. Però donat que els volàtils es detecten a distància, el nivell d'activació provocat pels mateixos no estaria correlacionat amb el temps que els animals passen damunt del recipient que conté la borumballa.

Les dades anatòmiques disponibles donen suport a aquesta hipòtesi. Així, els illots laterals i caudals reben projeccions olfactives des del CoApl (Ubeda-Bañón et al., 2007; Gutierrez-Castellanos et al., 2008), en lloc de rebre aferències vomeronasals com els ICj més medials.

Donat que, com ja hem dit en la introducció, l'estriat ventral constituïx un node central en el circuit cerebral del reforç (veure Wise, 2005) junt amb altres centres l'amígdala, és raonable suposar que aquestes projeccions podrien estar implicades en codificar el valor *reforçant* d'estímuls olfactius intrínscament reforçants. Entre aquests, destaquen les feromones mamàries que indueixen la recerca del mugró en conillets neonats (veure Hudson i Distel, 1986; Schaal et al. 2003; Coureaud et al., 2008).

Igualment, el ICjL podrien estar implicats en el processament d'estímuls olfactius reforçants secundaris, i ho podrien fer a través d'aferències des de l'amígdala basolateral que, d'acord amb les dades anatòmiques disponibles en ratolí (Novejarque 2007/08) i en rata (Fallon et al., 1978), sembla innervar les neurones granulars dels

illots de Calleja. En aquest sentit, hi ha evidència que les projeccions de l'amígdala basolateral a l'estriat ventral estan implicades en l'expressió de comportaments d'atracció cap a reforços secundaris. De fet, la lesió de l'amígdala basolateral afecta a l'adquisició de preferència de lloc (Everitt et al., 1991) i l'execució d'accions instrumentals dirigides a l'adquisició d'un reforç secundari condicionat després de la seua associació amb el sexe (Everitt et al., 1989) o aigua (Cador et al., 1989) com a reforçants incondicionats (primaris). És a dir, que els processos d'aprenentatge que es donen a l'amígdala basolateral doten els estímuls neutres de propietats atractives degut a la seua associació amb reforçants primaris. Així doncs, a través de les seues projeccions a l'estriat ventral, l'amígdala basolateral mitjançaria respostes d'atracció dirigides cap a estímuls amb propietats atractives adquirides.

Com hem vist, la borumballa embrutada per mascles conté volàtils que resulten neutres per a femelles químicament verges (Moncho-Bogani et al., 2002; Martínez-Ricós et al., 2007; Capítols 1 i 2 d'aquesta tesi), però que poden adquirir propietats atractives de manera secundària per associació amb les feromones no volàtils i vomeronasals intrínscament atractives i reforçants (Martínez Ricós et al., 2008; Capítols 1 i 2 d'aquesta tesi). Aquesta associació es podria produir a l'amígdala basolateral, ja que aquesta rep projeccions tant del còrtex olfactiu (McDonald, 1998) com de

l'amígdala medial (Canteras et al., 1995; Pitkänen, 2000; Canteras et al., 1992). De fet, Moncho-Bogani et al. (2005) demostraren que quan les femelles de ratolí químicament verges exploren la borumballa embrutada per mascles no solament s'activen els sistemes vomeronasal i olfactiu, sinó també centres dels circuits cerebrals del reforç que inclouen parts de l'amígdala basolateral. A més, l'exploració de volàtils de mascle que han adquirit propietats atractives de manera secundària activa l'amígdala basolateral. Aquests resultats suggereixen que l'amígdala basolateral podria constituir el centre al què es dona l'associació entre estímuls vomeronasals intrínscament reforçants i olors a priori neutres.

3.4.6 Sobre l'organització funcional de l'estriat ventral

Com indica el seu nom, el tubercle olfactiu sol considerar-se una estructura exclusivament olfactiva, ja que rep projeccions des dels bulb olfactius (Scalia i Winans, 1975; Broadwell, 1975; Shipley i Adamek, 1984). Hi ha treballs més recents, però, que han revelat que aquesta estructura està implicada en els mecanismes del reforç. De fet, tant l'estimulació elèctrica (Prado-Alcala i Wise, 1984) com l'administració de drogues addictives (Kornetsky et al., 1991; Stein i Fuller, 1992; Porrino et al., 2002; Ikemoto et al., 2005; Sellings et al., 2006) en el Tu resulten ser reforçants.

D'altra banda, els estudis del grup d'Ikemoto, (Ikemoto et al., 2003; 2005), sobre el paper de l'estriat ventral en processos de reforç primari relacionat amb el consum de drogues, i en concret de la cocaïna i la D-amfetamina, corroboren el paper del Tu als mecanismes del reforç i, en particular a la seua regió més medial. Així, els resultats d'aquests treballs indiquen que la cocaïna autoadministrada intracerebrament a través d'una cànula, sols és reforçant si la cànula es situa al límit entre el Tu medial i l'escorça del NAC més medial. En aquestes condicions, les propietats reforçants de la cocaïna depenen en gran mesura dels seus efectes farmacològics dopaminèrgics (els antagonistes de la dopamina disminueixen la seua autoadministració). En base a aquests resultats, aquests autors proposen que la compartimentació funcional de l'estriat ventral ha de fer-se seguint una divisió medio-lateral en lloc de la divisió clàssica segons un model de dins-a-fora: el centre del NAC, l'escorça del NAC i el tubercle olfactiu. Una interpretació alternativa als seus resultats, i coherent amb els nostres i les dades anatòmiques de connexions amb l'amígdala, seria que el límit entre Acb i Tu, on estan situats els ICj i els CB, fora fonamental en el reforç induït per la cocaïna.

Aquesta possibilitat ve reforçada pel fet que la cocaïna també actua com agonista de la serotonina sobre receptors 5HT-2A (Bubar i Cunningham, 2006) i que aquests s'expressen a nivells molt elevats

en les cèl·lules de la capa 3 del Tu i, especialment, en les cèl·lules dels ICj (Mijnster et al., 1997; Jansson et al., 2001).

Aquests resultats, recolzen la idea que Tu medial junt amb els CB i els ICj medials constituïrien el substrat anatòmic per al reforç degut a senyals vomeronasals i, junt amb les dades d'Ikemoto, ens porten fins i tot a proposar que les propietats addictives de la cocaïna en rosegadors es podrien deure a que imitaren o modularen els efectes reforçants dels senyals químics (i potser d'altres estímuls) de caire sexual, per mitjà de la seua acció en aquestes estructures (Novejarque 2007/2008).

En aquest sentit, cal destacar que el Tu no solament rep projeccions olfactives, sinó també vomeronasals (dels del CoApm i l'AHA) i, fins i tot, multimodals (des de l'amígdala basolateral) que, com ja hem discutit, es troben organitzades seguint un patró medio-lateral, on la regió medial rep projeccions vomeronasals (CoApm i AHA) mentre que la part més lateral està innervada per l'amígdala basolateral i el CoApl (Novejarque 2007/2008; Úbeda-Bañón et al., 2007; 2008; Gutierrez-Castellanos, et al., 2008).

Per tot açò, la part medial del tubercle olfactiu junt amb els CB i els ICj veïns formarien una regió clau en el processament de la informació vomeronasal, que podria estar relacionada amb la senyalització del reforç degut a senyals químics detectats per l'òrgan vomeronasal.

3.4.7 Interpretació funcional: el circuit del reforç de feromones

Com hem vist, tant l'escorça vomeronasal (CoApm i AHA) com els ICjvm són activats durant l'exploració de les feromones masculines, i l'activació mostra una clara correlació amb el temps d'exploració a curta distància de la borumballa.

Les dades anatòmiques detallades a dalt indiquen que, de fet, aquests centres estan connectats entre ells. Per tant, si les feromones sexuals reforçants són responsables de l'activació d'aquest circuit, cap esperar que a tots els animals els diferents centres d'aquest circuit mostren un grau d'expressió de c-fos equivalent, de forma que hi haurà una forta correlació entre el grau d'expressió de c-fos als diferents nuclis del circuit. Si les connexions foren excitadores la correlació seria positiva, mentre que les connexions inhibidores resultarien en correlacions negatives

Les dades de correlació indiquen, doncs, que el circuit estimulat per les feromones, molt probablement implicat en la senyalització del seu valor reforçant seria el que formarien el CoApm i l'AHA i les seues connexions amb els illots de Calleja (Figura 39).

Així no obstant, l'AHA també presenta projeccions massives al septum lateral ventral, a l'hipotàlem ventromedial a través de la stria terminalis (Canteras et al., 1992) i altres centres vomeronasals

secundaris subpalials, com ara l'amígdala medial (Gomez i Newman, 1992; Canteras et al., 1995) o la divisió posteromedial del nucli de la stria terminalis (Dong i Swanson, 2004), també contribueixen a aquesta projecció. A través d'aquesta via, els centres vomeronasals mitjancen la influència de les feromones sobre l'activitat dels principals nuclis del cervell sexualment dimòrfic, a saber, el nucli preòptic medial, els nuclis anterior i ventromedial hipotalàmics, el nucli premamilar ventral i el septum lateral ventral. Aquestes vies i centres s'han relacionat amb respostes comportamentals i endocrines a feromones en el context de la reproducció (front a congèneres de l'altre sexe) i les trobades agonístiques (front a congèneres del mateix sexe, especialment entre mascles) (Coolen et al., 1996; Canteras, 2002).

Per la seua banda, el CoApm no projecta a l'hipotàlem (Price et al., 1991; Canteras i Swanson, 1992; Chiba, 2000), mentre que ni la MeA ni el BSTpm projecten a l'estriat ventral (Gomez i Newman, 1992; Canteras et al., 1995; Dong i Swanson, 2004). Així doncs, a través de dues vies anatòmiques ben definides, el sistema vomeronasal sembla tindre influència en dos tipus de respostes. D'una banda, la via de la stria terminalis permetria l'execució de comportaments específics d'espècie (trobades agonístiques, comportament sexual) i respostes neuroendocrines associades (per exemple un alliberament sobtat d'hormona luteinitzant, Beltramino i

Taleisnik, 1983). D'altra banda, la projecció des del cortex vomeronasal a territoris de l'estriat ventral constitueixen molt probablement, la via neural per respostes afectives (hedònia, increments de motivació) induïdes per les feromones sexuals.

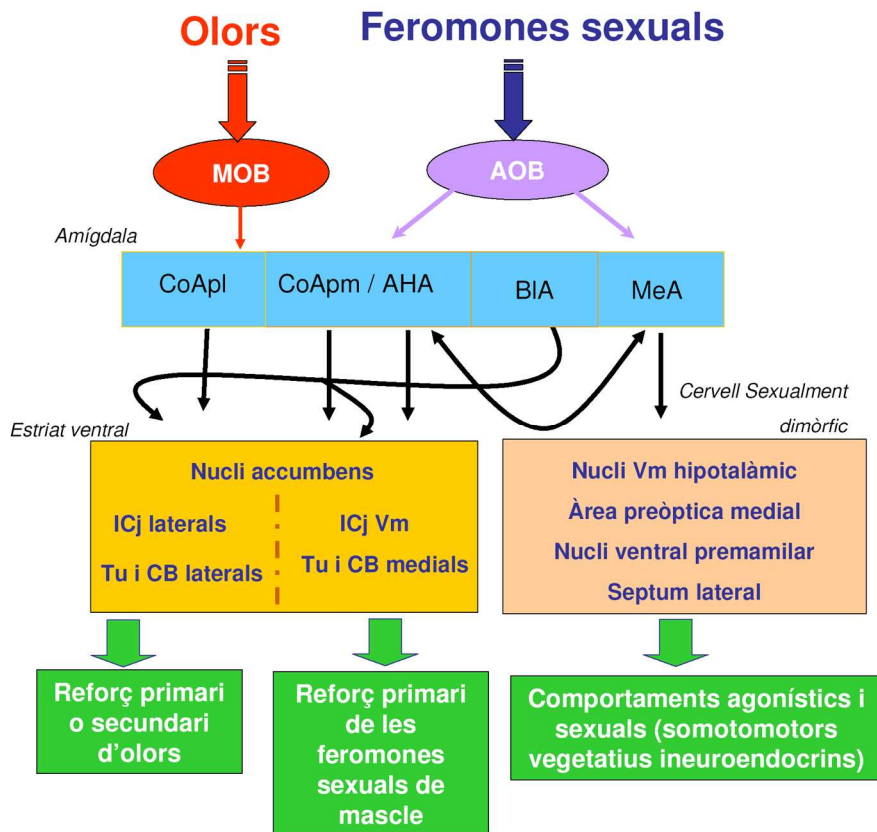


Figura 39. Vies neurals que mitjançarien les propietats reforçants dels estímuls olorosos (ja foren de caràcter primari o secundari) o vomeronasals. Per a explicació veure text. Abreviatures: AHA, àrea amígdalo-hipocàmpica; BLA, amígdala basolateral; CoApl: nucli posterolateral de l'amígdala; CoApm: nucli posteromedial de l'amígdala; MeA: amígdala medial.

4.CAPÍTOL 4

Discussió General

4.1 BIOLOGIA DE L'ATRACCIÓ SEXUAL

La reproducció sexual presenta avantatges evolutius a llarg termini, relacionats, sobretot, amb la generació de diversitat genètica (Rice, 2002). Però a la vegada requereix d'una inversió molt gran d'energia i recursos, principalment en la producció d'ous per part de les femelles així com en la cerca de parelles sexuals de qualitat (Ramm et al., 2008). Al llarg de l'evolució, les distintes espècies han anat desenvolupant mecanismes particulars per comunicar-se amb els seus congèneres i transmetre i percebre la informació relacionada amb la cerca de la parella sexual adequada que, a la vegada que efectius, suposen costos raonables d'energia. Aquestes estratègies inclouen mecanismes per a la senyalització de la presència, de la disponibilitat, i fins i tot de la qualitat com a parella sexual. En moltes espècies, sobretot aus i mamífers, aquests mecanismes consisteixen d'estímul visual o auditiu que, malgrat resultar efectius, no estan lliures de riscos, ja que també poden atraure depredadors.

Pel contrari, altres espècies han desenvolupat mecanismes alternatius que consisteixen en alliberar substàncies químiques a l'exterior per a advertir de la seua presència. Aquestes substàncies implicades en la comunicació entre individus de la mateixa espècie

s'anomenen feromones (Karlson i Luscher, 1959), i aquelles relacionades amb la comunicació intersexual en particular, feromones sexuals. En alguns casos una quantitat molt reduïda d'aquestes feromones pot ser efectiva, de manera que fa molt "barata" la comunicació intersexual, com ocorre en algunes espècies d'arnes i d'altres lepidòpters (veure Wyatt, 2003). En canvi, altres espècies excreten grans quantitats de substàncies aparentment implicades en la comunicació intraespecífica. Així, els mascles d'alguns rosegadors alliberen quantitats enormes d'un tipus de proteïnes que es solen considerar reservori de feromones (Sharrow et al., 2002). Aquestes molècules s'anomenen proteïnes majoritàries de l'orina (MUPs, de l'anglès *Major Urinary Protein*), i estan presents en l'orina a concentracions de fins 30mg/ml (veure Beynon et al., 2008). A més a més, els mascles de ratolí inverteixen una quantitat considerable de temps i energia en mantenir fresques les marques d'orina en punts crítics del seu territori (Hurst i Beynon, 2004). Per tant, en aquest cas, el cost és bastant més alt, però d'altra banda els senyals químics proveeixen un missatge clar als conespecífics (possibles parelles sexuals i competidors), a la vegada que no resulten massa perillosos respecte de possibles depredadors, ja que per a quan el possible depredadors detectara el senyal, l'animal

responsable d'aquesta marca podria no trobar-se ja ni en les proximitats de la marca.

L'efectivitat de les feromones com a reclam en el context de la comunicació intersexual es deu, entre d'altres propietats dels senyals químics, a la seua estabilitat en el temps, a que poden ser detectades a distància i a través de certes barreres, i fins i tot en condicions de foscor. Però sobretot a la capacitat que tenen de resultar atractives per als rebedors potencials d'aquestes (les possibles parelles sexuals). De fet, aquesta característica va permetre la identificació de la primera feromona sexual en insectes que va promoure l'aplicació del terme feromona (Karlson i Luscher, 1959). Alguns mascles d'arna, en detectar uns pocs centenars de molècules d'una feromona alliberada per les femelles (Reynolds et al., 2007) responen variant de manera sobtada la seua direcció de vol cap a la font d'aquest senyal o expressant pautes comportamentals del festeig. La enorme potència d'aquestes feromones com a mediadors químics de l'atracció sexual va despertar l'interès dels investigadors i del públic. La qüestió que es va plantejar d'immediat era si en mamífers, i fins i tot als éssers humans, podrien existir senyals químics que instigaren una motivació sexual similar.

L'evidència de l'existència de senyals químics amb propietats atractives en mamífers (veure revisió de Doty, 2003) i menys encara en humans, és més bé escassa.

4.2 TENEN FEROMONES SEXUALS ELS MAMÍFERS? LA IMPORTÀNCIA DE CONSIDERAR L'EXPERIÈNCIA

Com ja hem discutit prèviament, els rosegadors són els animals macrosmàtics més estudiats i la seua orina conté una enorme quantitat de molècules que semblen estar implicades en la comunicació intraespecífica. Per tant, hom esperaria que la majoria dels rosegadors mostraren comportaments particulars en resposta a la detecció de feromones. De fet, les femelles de rata i ratolí mostren una sèrie de respostes neuroendocrines cap a l'orina de conespecífics, el que suggereix que els rosegadors excreten o secreten feromones preparadores (Halpern i Martinez-Marcos, 2003; veure Introducció capítol 2). En ratolí, aquestes respostes inclouen la fallada de la implantació de l'embrió per orina d'un mascle distint al responsable de l'embaràs (efecte Bruce), la suspensió de l'estre deguda a la superpoblació de femelles, la inducció de l'estre en femelles adultes, i l'acceleració de la maduresa sexual en femelles

immadures sexualment per l'orina d'un mascle (per a una revisió veure Halpern, 1987).

En la mateixa línia, hi ha evidència que molts rosegadors utilitzen feromones desencadenants (veure Introducció capítol 2), és a dir, que indueixen canvis comportamentals, com són les feromones sexuals. Per exemple, està clarament demostrat que els individus adults exploren més l'orina o la borumballa embrutada per conespecífics del gènere contrari [veure estudis en ratolí (Drickamer 1989); rata (Portillo i Paredes, 2004); conillets d'índia (Beauchamp et al., 1982) i hámsters (Petrulis et al., 1999)]. A més a més, es ben conegut que les respostes dels mascles cap a senyals d'intrusos són específiques de gènere: mentre que els mascles intrusos resulten atacats (agressió entre mascles), si l'intrús és una femella, els mascles emeten vocalitzacions ultrasòniques de 70-KHz (Nyby et al., 1983; Holy i Guo, 2005) com a part del ritual de festeig, i intenten muntar-les. Aquestes respostes semblen estar mitjançades per senyals químics. Així, els mascles de ratolí ignoren mascles intrusos introduïts a la seua gàbia si aquests mascles estan castrats, però els agredeixen amb violència si els castrats intrusos son impregnats d'orina d'un mascle intacte (Stowers et al., 2002).

Malgrat que aquestes dades podrien semblar una evidència sòlida de que existeixen feromones procedents de rosegadors, aquestes

respostes podrien ser conseqüència de l'experiència prèvia. D'acord amb la definició clàssica (Karlson i Luscher, 1959), per a considerar que una substància és una feromona, aquesta deu d'originar respostes estereotipades en conespecífics, la qual cosa implica respostes no apreses, sinó innates o incondicionades (veure discussió en Martínez-García et al., 2008). En altres paraules, la presència d'una resposta comportamental front a senyals químics procedents de conespecífics de l'altre gènere no és una demostració que aquests senyals siguin una feromona. De fet, a mesura que els mascles i les femelles guanyen experiència sexual, un conjunt d'estímuls relacionats amb les seues parelles sexuals poden ser associats amb el sexe. A través d'aprenentatge associatiu aquests estímuls de les parelles sexuals, incloses les olors, poden tornar-se atractius de manera secundària. Per exemple, les femelles a les que se'ls presenta una olor sintètica quan estan mantenint relacions sexuals consentides (el que en anglès s'anomena *paced mating*) desenvolupen preferència per mascles impregnats amb aquesta olor. També els ratolins desenvolupen altre tipus de respostes condicionades cap a olors derivades de parelles sexuals. De fet, ha estat demostrat que els mascles de ratolí poden ser induïts a emetre vocalitzacions ultrasòniques cap a orina de femelles de rata quan se'ls presenten femelles de ratolí impregnades amb orina de rata

(Kerchner et al., 1986). Encara més, si es permet als mascles interactuar amb femelles que han ingerit una gran quantitat de fenigrec, una espècia amb una olor peculiar, aquests mascles emetran vocalitzacions quan se'ls presenta fenigrec a soles (Kerchner et al., 1986). El mateix tipus de respostes condicionades podrien ocórrer cap a olors secretades per animals, que aleshores esdevindrien atractius de manera secundària, però que no podrien ser considerats feromones, degut a que la resposta que desencadenen no seria innata, sinó apresada.

Els experiments dels capítols 1 i 2 d'aquesta tesi demostren, en conjunt, que els mascles de ratolí secreten feromones sexuals no volàtils que són detectades pel sistema vomeronasal de les femelles. Aquestes feromones tenen, a més, propietats reforçants per a les femelles de ratolí. Com hem explicat anteriorment (veure Materials i Mètodes del capítol 1), les femelles utilitzades en aquests experiments són "químicament verges", la qual cosa vol dir que no han estat mai en contacte amb senyals químics procedents de mascles adults. Els senyals procedents de mascles prepúbbers no indueixen aquesta preferència (Scott and Pfaff, 1970; Jones and Nowell, 1974) i, per tant, és de suposar que no secreten aquestes feromones. Per tant, les respostes comportamentals que observem front a senyals de mascle són incondicionades, és a dir, innates.

Quan les femelles són exposades per primera vegada a borumballa embrutada per mascles adults, manifesten una preferència cap a aquesta solament quan se'ls permet fer contacte directe amb la mateixa (és a dir, quan poden detectar tant senyals volàtils com no volàtils). Però no quan el contacte directe és evitat mitjançant una plataforma perforada que, per tant, solament permet detectar els volàtils que emanen de la borumballa. Les femelles ja no la prefereixen front a senyals ni de femella (Moncho-Bogani et al., 2002) ni de mascle castrat (Capítol 1 d'aquesta tesi; Martínez-Ricos et al., 2007). Per tant, la borumballa embrutada per mascles conté senyals no volàtils que en resultar innatament atractius per a les femelles i induir comportament exploratori de manera incondicionada poden ser qualificades de feromones atenent a la definició clàssica (Karlson i Luscher, 1959).

Aquestes feromones semblen estar implicades en el reconeixement del gènere de conespecífics. Com ja hem discutit prèviament, l'atracció que exerceixen aquests senyals sobre les femelles (Moncho-Bogani et al., 2002) es pot considerar un comportament precopulatori ja que consisteix en el primer pas cap a l'encontre de la parella sexual. A més, és un comportament dirigit cap a un gènere en concret, ja que les femelles de ratolí prefereixen les feromones de mascle quan aquestes són enfrontades a feromones de qualsevol

tipus de conespecífic, incloent femelles (Mossman i Drickamer, 1996). Les femelles de ratolí amb l'AOB lesionat (Capítol 1 d'aquesta tesi) poden detectar senyals de mascle (com mostren els experiments d'habitució-deshabitució) però no poden identificar la font de l'estímul com procedent de mascle. És per això que no manifesten el comportament dependent de gènere apropiat (la preferència respecte de la borumballa de mascle castrat en aquest cas), com mostra l'experiment de test d'elecció simple. Aquests resultats són equivalents als efectes sobre altres comportaments sexuals que provoquen les lesions del sistema vomeronasal, ja es tracte de lesions físiques com genòmiques que, malgrat que tenen conseqüències distintes o amb diferent intensitat, en general resulten en una incapacitat dels animals d'identificar el gènere dels conespecífics (veure Discussió Capítol 1).

4.2.1 La identitat química de les feromones sexuals masculines del ratolí

L'orina dels mascles es caracteritza per una elevada concentració de proteïna, un 99% de la qual correspon a les anomenades proteïnes principals o majoritàries de l'orina o MUPs (de l'anglès *Major Urinary Proteins*). Aquestes proteïnes són globulines sintetitzades al fetge d'una forma dependent de la testosterona, i són majoritàriament

excretades a l'orina (Wicks, 1941;; Figura 40). Pertanyen a una família de proteïnes conegudes com *lipocalines*, caracteritzada per posseir bosses hidrofòbiques a les quals estableixen unions bastant fortes amb petites molècules de naturalesa lipídica.

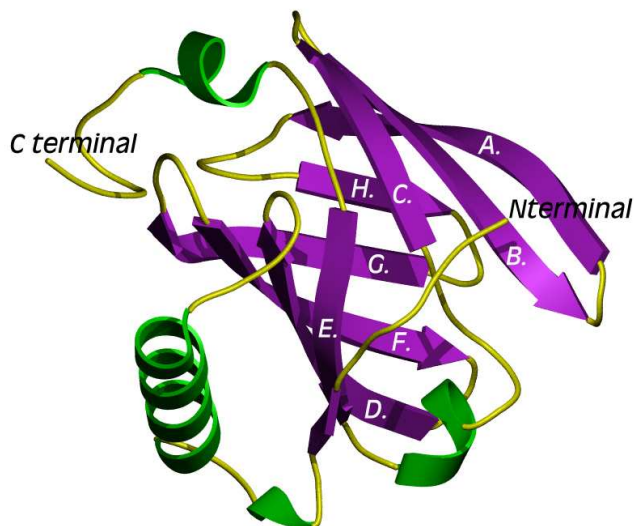


Figura 40. Estructura d'una MUP a la què els extrems N- i C-terminal estan marcats. Les MUPs pertanyen a la família de les lipocalines, el que vol dir que està constituïda per 8 filaments plegats seguint una estructura de barril β (en morat a la imatge), dins la qual es troba el calze d'unió per a possibles lligands.

S'ha vist que indueixen agressió entre mascles en ser detectades per una població concreta de cèl·lules de l'OVN (Chamero et al., 2007) i que contenen informació tant pel que fa a la *masculinitat* de l'individu com fins i tot a la seua identitat (Hurst et al., 2001; Cheetham et al., 2007). A més, també hi ha evidència de que les

MUPs de mascles indueixen l'ovulació en les femelles als ratolins (Morè, 2006). Per tant, seria possible que la feromona sexual de mascle que resultat atractiva i reforçant per a les femelles que es troba a la borumballa embrutada per mascles fora una MUP o una combinació de vàries MUPs.

Però a l'orina dels mascles també hi ha molècules volàtils la síntesi de les quals depèn de testosterona, i que tenen valor feromonal aparent, ja que resulten atractives per a les femelles (Jemiolo et al., 1991) i tenen efectes sobre la fisiologia reproductiva d'aquestes (Novotny et al., 1999; Leinders-Zufall et al., 2000) a més d'induir l'agressió entre mascles (Novotny et al., 1985). D'entre aquestes molècules destaquen la 2-sec-butyl-4,5- dihydrothiazole també coneguda com (la *tiazolina*), la 2,3-dehydro-exo-brevicomín, normalment anomenada com *brevicomina*, i dos farnesens. l'E,E- α -farnesé i l'E- β -farnesé (els *farnesens*). Per tant, no es pot descartar que, almenys en part, els volàtils també juguen un paper clau en la senyalització del gènere. En favor d'aquesta possibilitat cal remarcar el treball de Boschat et al. (2002), qui ha demostrat que a l'OVN hi ha receptors específics per a almenys un altre volàtil present a l'orina amb possible valor feromonal. Els autors troben que les neurones de l'OVN que expressen un receptor VR1 concret, el VRrb2 detecten la 2-heptanona de manera molt selectiva ja que no responen ni a altres

substàncies de valor feromonal reconegut com són la 2,5-dimethylpyrazina (Novotny et al., 1985; Jemiolo et al., 1989), i els farnesens (Novotny et al., 1990), ni tan sols a anàlegs estructurals de la 2-heptanona. A més, també troben que la 2-heptanona provoca resposta a l'OVN d'animals mutants amb una deleció d'un grup de gens dels receptors VR1 que inclouen el *v1rb2*, el que indica que hi haurà altres receptors que també detecten aquesta molècula. Aquest fet indica que la detecció de la 2-heptanona a través de l'OVN ha de tenir rellevància en el comportament dels ratolins.

Malgrat això, s'ha vist que molècules com la brevicomina, la 2-heptanona i la tiazolina, no indueixen *c-fos* a l'OVN quan l'animal és exposat a elles aïlladament, el que podria estar indicant que per elles mateixes aquestes molècules no poden accedir a l'OVN (Kimoto et al., 2005) ni, per tant, són capaces d'activar les cèl·lules mitrals del bulb olfactiu accessori (Luo et al., 2003). Aquests resultats podrien estar indicant que, si bé molècules volàtils com la 2-heptanona podrien tenir un paper en la senyalització del gènere masculí, pot ser requereixen d'altres substàncies d'alt pes molecular per accedir a l'OVN o per activar (actuant cooperativament) les cèl·lules de l'OVN i les cèl·lules mitrals de l'AOB.

En aquest sentit, els efectes comportamentals i endocrins que diversos autors (Novotny et al., 1985; 1990; Jemiolo et al., 1989) han

mostrat front a alguns d'aquests volàtils (tiazolina, brevicomina, farnesens) podrien ser respostes condicionades, degudes a l'experiència quimiosensorial prèvia. Més encara, algunes d'aquestes molècules, com els farnesens, es troben també a l'orina de rata (Zhang et al., 2008), i per tant, no sembla raonable que juguen un paper com a feromones sexuals als ratolins.

En aquest sentit és important destacar que les MUPs tenen una cavitat central que pot unir molècules lipofíliques, com per exemple la tiazolina i la brevicomina. Tant és així, que la immensa majoria d'aquestes molècules presents a l'orina de mascles està unida a MUPs (Bacchini et al., 1992; Robertson et al., 1993; Novotny et al., 1999). Una vegada que es diposita una marca d'orina al medi, els volàtils units a les MUPs comencen a difondre, però més lentament que si no estigueren units a elles (Hurst et al., 1998; Robertson et al., 2001; Armstrong et al., 2005), de manera que aquesta unió afavoreix que el senyal volàtil siga accessible per a altres individus durant més temps (Hurst et al., 1998; Humphries et al., 1999). De fet, el grup de Jane Hurst ha caracteritzat una MUP que té especial afinitat per la tiazolina, i que a més, la reté durant més temps, de manera que apareix com una ferma candidata a ser la proteïna responsable d'unir la tiazolina per tal d'afavorir la seua difusió

gradual a les marques deixades pels mascles (Armstrong et al., 2005).

Per tot això, sembla raonable hipotetitzar que les feromones sexuals de mascle estiguen formades per molècules volàtils com la 2-heptanona, la tiazolina, la brevicomina o els farnesens, i per proteïnes d'alt pes molecular com les MUPs. La unió a les MUPs afavoriria, d'una banda, que els volàtils accedirien a l'OVN, i d'altra banda, permetria que aquests volàtils difongueren més lentament a les marques deixades a l'entorn. De fet, es sap que les MUPs parcialment purificades de l'orina de mascles i dissoltes en orina de mascle juvenil indueixen acceleració de pubertat en femelles (efecte Vandenberg), fins i tot seguint procediments per eliminar totalment els seus possibles lligands. En canvi, solament la porció volàtil no és capaç de restaurar aquest efecte en l'orina de mascles immadurs (Mucignat-Caretta et al., 1995). Aquests resultats semblen indicar en conjunt que, almenys per a induir certs comportaments, les MUPs requereixen dels volàtils i aquests de les MUPs per ser capaços d'actuar com a feromones.

La possibilitat que l'activitat feromonal es dega a un complex d'una molècula volàtil unida a una proteïna ha estat recentment demostrada per a la feromona de mascles de *Drosophila* que és atractiva per a les femelles (Vosshal, 2008). En aquest cas, la

molècula volàtils és cVA (11-cis vaccenyl acetate), que s'uneix a una proteïna anomenada LUSH induint un canvi conformacional en la mateixa que fa que el complex cVA-LUSH siga detectat pels receptors olfactivs Or67d i Or83d, que actuen en tàndem, en el sistema olfactiv de l'insecte. En conclusió, als ratolins, com passa a *Drosophila*, la feromona pot ser un complex de volàtil i proteïna.

Per últim, cal tenir en compte que els rosegadors tenen una sèrie de glàndules a través de les quals alliberen secrecions a l'exterior, a banda dels senyals excretats a través de l'orina. Per tant, resulta interessant explorar la possibilitat que certs senyals procedents d'aquestes glàndules pugueren estar implicats en la codificació del gènere i, per tant, en la comunicació intersexual, com s'ha demostrat a les sarigues (Wang et al., 2007).

De fet, el grup de Kimoto ha analitzat senyals provinents de diferents glàndules de mascles de ratolí i ha trobat que hi ha dues molècules secretades per la glàndula supramaxilar i per la glàndula extraorbital, respectivament, que provoquen inducció de c-fos a l'OVN de les femelles, en concret en neurones que expressen receptors de tipus V2R. La feromona secretada per la glàndula extraorbital a la que anomenen ESP1 (de l'anglès *exocrine gland-secreting peptide*) indueix expressió de c-fos a l'OVN de les femelles però no dels mascles, probablement perquè els mascles estan en

contacte sempre amb la seua pròpia ESP i per tant les neurones dels seus OVN no expressen c-fos en resposta a aquest estímul.

4.3 FEROMONES, ATRACCIÓ I REFORÇ

Un estímul pot ser considerat atractiu si es detectat des de la distància i la seua detecció condueix a la cerca de la font que el produeix (per exemple les olors o els estímuls visuals o auditius). Com ja hem discutit prèviament, els estímuls vomeronasals solament poden ser detectats mitjançant contacte directe (Luo et al., 2003; els nostres resultats), però malgrat això, “atrauen” les femelles de ratolí. Aquesta “atracció” solament pot ser explicada si les feromones de mascle són reforçants per a les femelles, tal i com ho són altres estímuls reforçants malgrat requerir del contacte directe per ser detectats, com és el cas del sabor dolç de la sacarosa o la sacarina (Berridge, 2003).

Amb l'objectiu d'explorar la possibilitat que les feromones sexuals de mascle suposaren una recompensa per a les femelles de ratolí, hem utilitzat un test estàndard que es fa servir per a analitzar les propietats reforçants de drogues o estímuls naturals, el test d'adquisició de preferència condicionada de lloc (*place preference*, en anglès). Aquest test consisteix en reforçar una posició concreta d'una caixa de test amb l'estímul a analitzar durant una sèrie de sessions d'aprenentatge. És a dir, durant aquestes sessions l'estímul es col·locat sempre en la mateixa posició de la caixa, de manera que si detectar-lo suposa una recompensa per als animals, aquests

adquireixen preferència per aquesta posició de la caixa, de manera que passaran més temps en aquest lloc que en les altres parts de la caixa fins i tot en absència de l'estímul reforçant. Utilitzant aquesta estratègia, explorarem les propietats reforçants de senyals procedents de distints tipus de conespecífics (mascles intactes, mascles castrats i altres femelles) en femelles de ratolí. Els resultats d'aquests experiments indicaren que solament la borumballa embrutada per mascles és capaç d'induir adquisició de preferència de lloc per la posició de la caixa en què són presentades sistemàticament durant les sessions d'aprenentatge. Com era d'esperar, les femelles adquireixen aquesta preferència si durant les sessions d'aprenentatge se'ls permet fer contacte directe amb aquesta borumballa (i per tant poden detectar les molècules no volàtils que aquesta conté). Pel contrari, els volàtils de mascle que emanen de la borumballa embrutada per mascles, per si mateixos, no són capaços d'induir preferència de lloc. En conjunt, tots aquests resultats indiquen que les femelles de ratolí són atretes innatament per certes feromones no volàtils i detectades pel sistema vomeronasal que tenen, a més, propietats reforçants per a elles.

4.4 LES FEROMONES I EL REFORÇ DEL SEXE

En rosegadors està demostrat mitjançant paradigmes d'adquisició de preferència de lloc (*place preference; PP*), que el sexe és un reforçament natural (Meissel i Jopa 1994; Meisel et al., 1996; Paredes i Alonso 1999; Hugues et al., 1990; Mehara i Baum 1990; Miller i Baum 1987; Agmo i Berenfel, 1990; Agmo i Gomez, 1993), de la mateixa manera que ho són el menjar (Lepore et al., 1995; Papp, 1988a; Papp et al., 1991; Cheeta et al., 1994), el sabor dolç (Kelley i Berridge, 2002) i l'aigua (Crowder i Hutto 1992a; Agmo et al., 1993; Perks i Clifton 1997). De fet, el sexe és capaç de produir PP perquè inclou una sèrie d'estímuls reforçants relacionats amb la parella sexual. Per això, la pràctica del sexe ve associada a l'obtenció d'un munt d'estímuls gratificants que fan que el comportament sexual es reforce, augmentant així l'eficàcia de les interaccions sexuals amb l'experiència (Meisel i Mullins, 2006; Del Punta et al., 2002).

El que no està clar és quins estímuls dels associats amb tot el repertori de pautes copulatòries i paracopulatòries són reforçants. Els nostres resultats suggereixen que, al menys en femelles de ratolí, l'accés a les feromones sexuals de mascle al OVN és reforçament. Hi ha evidències prèvies que suggereixen que aquesta estimulació reforçament té importància pel manteniment del comportament sexual en les femelles de rosegador. Així, Kohlert i Olexa (2005) analitzaren si la

estimulació genital deguda a la intromissió per part del mascle era l'element reforçant per les femelles de hámster. Per això, estudiaren si la interacció sexual amb mascles induïa preferència de lloc en femelles a les què se'ls aplicava un tap vaginal, de manera que la intromissió per part del mascle no era possible. Els resultats indicaren que aquestes femelles desenvolupen preferència de lloc, i de la mateixa manera que en femelles normals, demostrant que la intromissió per part del mascle no és imprescindible per tal que les femelles troben reforçant la seua interacció amb ell. Els autors suggereixen que, fins i tot quan hi ha estimulació vaginal ha d'haver altres estímuls que també tinguen propietats reforçants per a elles.

Les propietats reforçants de les feromones sexuals obren la possibilitat que, al menys en animals macrosmàtics com els rosegadors, part del reforç del sexe es dega a la detecció de feromones sexuals de la parella, a més de la còpula en si. En aquest treball hem demostrat que les feromones sexuals de mascles són reforçants per a les femelles de ratolí.

Sembla prou lògic hipotetitzar a partir d'aquests resultats, que les feromones sexuals de femella també resultarien gratificants per als mascles, de manera que la seua detecció reforçaria el comportament sexual. De fet el grup de Beauchamp i col·laboradors, (1982; 1983; 1985) demostraren, de forma molt similar a nosaltres, que el

comportament de quimioinvestigació de la borumballa embrutada per femelles de conillet d'Índies de queia fins a extingir-se en mascles amb l'OVN lesionat. Segons els autors, aquest descens en el temps de quimioinvestigació semblava una extinció comportamental, del que conclouen que les feromones sexuals de femella detectades per l'OVN dels mascles podrien tenir un paper reforçant.

En aquest sentit, la resposta de les femelles cap al mascle durant les interaccions sexuals pot ser bastant agressiva (Feder, 1984), sobretot quan els mascles són inexperts i no han après, per exemple, que les femelles no són receptives quan no estan en estro (Edward, 1970; Feder, 1984). Per tant, és molt possible que les primeres interaccions sexuals siguin fins i tot negatives per als mascles, en quant a la còpula es refereix. Per tant, en el cas que la intromissió fora l'única recompensa que els mascles obtingueren, el comportament sexual podria no veure's reforçat. Tot i això, durant les primeres experiències sexuals, el nombre de còpules amb intromissió que materialitzen els mascles que és baix, es va incrementant amb l'experiència (Del Punta et al., 2002; Meisel i Mullins, 2006). Per tot això, és perfectament plausible que les feromones sexuals detectades per l'OVN durant la còpula i el comportament paracopulatori siguin capaces de reforçar el comportament sexual i garantir la seua

continuïtat i millora, fins que la taxa de còpula amb intromissió siga suficient per reforçar-lo també.

4.4.1 Comportament sexual sense funció vomeronasal

Al punt anterior hem plantejat la hipòtesi que en rosegadors la detecció de feromones sexuals a través de l'OVN siga responsable, almenys en part, del reforç que suposa el sexe en sí mateix. En consistència amb aquesta idea, s'ha vist que la integritat de l'OVN és essencial per a mantenir la taxa estàndard del comportament de munta en mascles de hámster sense experiència sexual (Meredith, 1986). A més, els mascles de ratolí als què els falta un grup de gens de receptors vomeronasals de tipus VR1 (Del Punta et al., 2002) mostren un comportament normal en els primers encontres sexuals, però el seu comportament copulatori decau amb l'experiència, el que contrasta amb els animals normals, en els què es dóna un increment de l'activitat sexual depenent de l'experiència. Encara que aquest dèficit podria superar-se parcialment amb un increment de l'activitat sexual (veure Pankevich et al., 2004), els resultats de Del Punta et al. (2002) suggereixen que en els mascles de ratolí sense experiència prèvia certes senyals detectades per l'OVN (molt probablement

feromones sexuals de la parella) constitueixen pistes reforçants molt importants per mantenir (i incrementar) l'activitat sexual original.

A més, la lesió de la funció vomeronasal, especialment a mascles verges, aboleix de manera completa el comportament de munta en mascles (Clancy et al., 1984), així com les respostes precopulatòries, com són les vocalitzacions ultrasòniques (Wysocki et al., 1982) i l'increment en els nivells de testosterona (Wysocki et al., 1983), en diferents espècies de rosegadors.

De manera similar, la lesió de la funció vomeronasal afecta de manera substancial al comportament sexual de femelles. Així, s'ha demostrat que la lesió de l'OVN en femelles de ratolí redueix significativament la receptivitat sexual i el comportament de lordosi en femelles de ratolí (Keller et al., 2006a). A més, els resultats dels nostres experiments mostren que les femelles amb el BOA lesionat, deixen de mostrar preferència cap als senyals de mascle (Martínez-Ricós et al., 2008; Capítol 1).

Com a conclusió, totes aquestes observacions, junt amb els nostres resultats d'aquest capítol i de l'anterior, suporten la hipòtesi que la detecció de feromones sexuals a través de l'òrgan vomeronasal és fonamental perquè el sexe siga reforçant als rosegadors, i per tant, per a mantenir l'activitat sexual estàndard. Malgrat això, cal recordar que com a estímul incondicionat, les feromones no volàtils poden ser

associades a altres estímuls (com per exemple olors detectades pel sistema olfatiu principal) que esdevinguen reforçants secundaris capaços de sostenir el comportament sexual per sí mateixos. Això explicaria l'efecte reduït de les lesions de l'OVN a animals amb experiència sexual prèvia (Meredith, 1986).

4.5 NEUROBIOLOGA DEL REFORÇ DE FEROMONES

4.5.1 Bases neurals del reforç per feromones sexuals

Com ja hem explicat prèviament, els experiments clàssics d'autoestimulació cerebral i de l'estudi de l'efecte de drogues sobre el reforç de certs comportaments (com per exemple pressionar una palanca) per mitjà de reforços naturals com el sabor dolç o el menjar, han portat a proposar com a circuit bàsic del reforç la via dopaminèrgica que transcorre des de l'àrea tegmental ventral fins l'estriat ventral, en particular sobre el nucli accumbens. Però, com també hem esmentat prèviament, el nombre de nuclis que formen el circuit del reforç s'ha incrementat com a conseqüència de treballs més recents (veure Introducció del Capítol 3), de manera que avui en dia es reconeix que l'amígdala basolateral i el còrtex prefrontal medial, fortament connectats amb l'estriat ventral (Swanson, 1982; Martínez-Hernandez, 2008/9) i entre ells (McDonald, 1991), també

estan implicats en els mecanismes del reforç (Routtenberg i Sloan, 1972; Baxter i Murray, 2002).

Com a estímuls reforçants naturals, les feromones sexuals deurién d'interactuar amb aquest sistema. El nostre treball ens permet suggerir una via anatòmica que mitjançaria aquesta interacció, segons la qual les feromones sexuals no farien servir la via tegmento-estriatal sinó vies amígdalo-estriatals.

En primer lloc hem demostrat que les feromones de mascle són detectades a través del sistema vomeronasal de les femelles, perquè la lesió de l'AOB elimina la preferència per la borumballa embrutada per mascles (Capítol 1 d'aquesta tesi; Martínez-Ricos et al., 2008). En segon lloc, hem vist que la seua detecció activa l'amígdala posteromedial cortical (Moncho-Bogani et al., 2005; Capítol 3 d'aquesta tesi) i l'àrea amígdalo-hipocàmica, dos centres clau de l'amígdala vomeronasal. I per últim hem demostrat que les feromones sexuals també activen els illots de Calleja medials (en concret els ventromedials; Capítol 3 d'aquesta tesi). També hem demostrat que l'activació d'aquests centres està correlacionada i depen del temps d'exploració de les feromones masculines contingudes a la borumballa embrutada per mascles.

Totes aquestes dades funcionals dibuixen una via anatòmica que constituiria la de l'accés dels estímuls vomeronasals als circuits

cerebrals del reforç (Figura 41). Aquesta hipòtesi es suportada per les dades neuroanatòmiques de Novejarque (2007/08) i Ubeda-Bañon et al., (2008), que indiquen la presència d'importants projeccions des del CoApm i l'AHA fins els ICj, els ponts cel·lulars i el Tu.

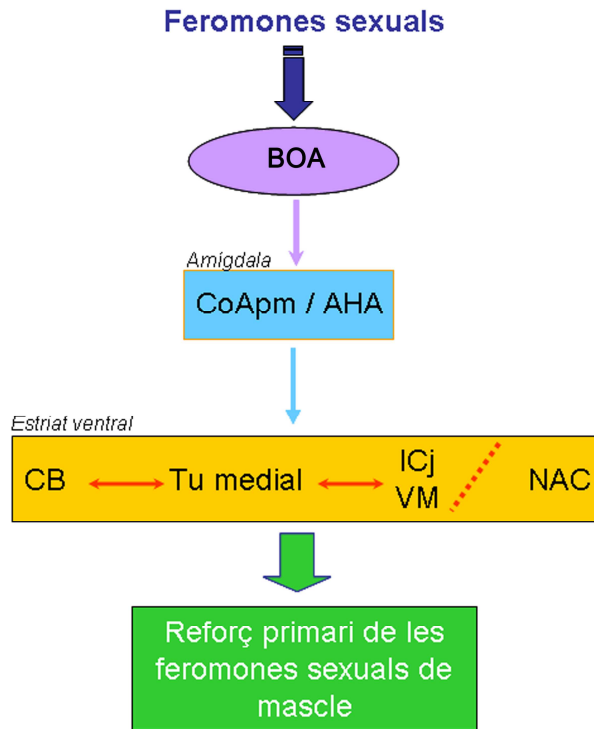


Figura 41. Esquema que representa la via que seria responsable de codificar les propietats reforçants de les feromones sexuals. Bulb olfactiu accessori (BOA); amígdala cortical posteromedial (CoApm), àrea amígdalo-hipocàmica (AHA), ponts cel·lulars (o *cell bridges*, en anglès, CB), tubercle medials (Tu medial), illots de Calleja ventromedials (ICj VM), nucli accumbens (NAC).

Per últim, el nostre grup ha demostrat que la lesió de centres d'aquesta via es tradueix en una pèrdua de la preferència de les femelles per les feromones masculines (Agustín-Pavón, 2008).

4.5.2 Neuroquímica del reforç per feromones sexuals

A banda de les dades anatòmiques i funcionals ja descrites que suporten la nostra hipòtesi, els experiments del nostre grup corroboren que, a diferència d'altres estímuls naturals, el reforç de les feromones sexuals de mascles és independent de l'alliberament de dopamina i de la via tegmento-estriatal clàssica. En primer lloc, l'anàlisi realitzada per Jose Moncho Bogani (2005) de l'expressió de c-fos al cervell de femelles exposades a feromones sexuals de mascle va provar que la detecció d'aquests estímuls activa certes àrees implicades en els mecanismes del reforç com és el nucli accumbens, però en canvi l'àrea tegmental ventral no s'activa. Posteriorment, el treball de Jose Martínez-Hernández (2006) mostrà que les lesions excitotòxiques de les neurones dopaminèrgiques de l'ATV mitjançant injeccions estereotàxiques de 6-OH dopamina, redueixen la preferència per sacarosa, però no alteren la preferència innata que les femelles mostren cap a feromones masculines. Per tant, confirmaven que el reforç degut a sacarosa està mediat per la via tegmento-estriatal clàssica, mentre que el degut a les feromones utilitzaria una altra via alternativa.

Com hem dit a l'apartat anterior, la via del reforç de feromones seria una projecció amígdalo-estriatal que no és de naturalesa dopaminèrgica, sinó probablement glutamatèrgica. De fet, el treball de Nicolás Gutiérrez Castellanos (Gutierrez-Castellanos et al., 2008), també membre del nostre grup, ha mostrat que les projeccions amigdalines sobre les regions de l'estriat ventral que suposem responsables del valor reforçant de les feromones (les que van des del CoApm fins els ICj, els CB i el Tu) són riques en Zn i, per tant, molt probablement glutamatèrgiques.

Per últim, Carmen Agustín Pavón (2008), ha estudiat l'efecte d'una bateria de fàrmacs agonistes i antagonistes de neurotransmissors, sobre el reforç de les feromones sexuals masculines en femelles de ratolí. Els resultats del seu treball suggereixen que la codificació del valor reforçant de feromones sexuals dependria de vies glutamatèrgiques i que la dopamina (DA), així com altres neurotransmissors, com els opiacis i l'òxid nítric (ON), podrien estar regulant aquesta via a diferents nivells (Figura 42)

Feromones sexuals

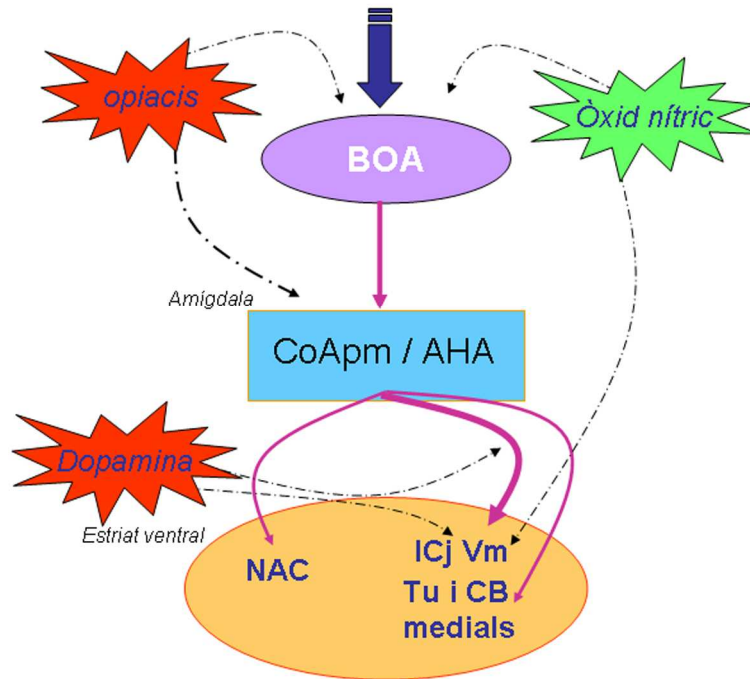


Figura 42. Neuroquímica dels circuits neurals responsables de la preferència per feromones sexuals basat en Carmen Agustín-Pavon (2008) i el present treball. Els punts de la via anatòmica en els quals determinats neurotransmissors podrien exercir el seu efecte s'assenyalen amb les fletxes negres discontinües. Els neurotransmissors representats en roig (la dopamina i els opiàcids) regularien la transmissió a la baixa, mentre que els representats en verd ho farien a l'alça. Les fletxes morades representen les projeccions glutamatèrgiques.

4.5.3 Diferents circuits per diferents plaers?

Tant els resultats del nostre grup com els d'altres autors confirmen que l'estimulació de l'estriat ventral és clau en la codificació del valor hedònic dels estímuls, ja que tots els sistemes sensorials accedeixen a ell i, per extensió, influeixen en l'activitat de les seues projeccions descendents al *pàlid* (Berridge, 2003). Però també qüestionen algunes de les premisses que s'han considerat certes durant molt de temps relatives als mecanismes cerebrals del plaer dels estímuls reforçants naturals. D'una banda, el paper de la dopamina en el reforç pot ser no és el de codificar el valor hedònic dels estímuls, el plaer que indueixen (com no ho és per exemple en cas de les feromones sexuals; Agustín-Pavón et al., 2007) sinó que la dopamina estaria implicada en altres aspectes dels processos relacionats amb el reforç, com són l'estat motivacional dels animals o l'aprenentatge associat (veure Berridge i Robinson, 2003). D'altra banda, sembla que és l'estimulació de certes subregions concretes dins de l'estriat ventral, i no l'estimulació de tot l'estriat ventral en general, la que codifica el valor reforçant dels estímuls plaents.

En aquest sentit, el grup de Berridge ha caracteritzat les reaccions facials d'hedònia front a estímuls gustatius dolços, que consisteixen d'un patró específic de protrusions de la llengua fàcilment reconeixibles i que, a més, es troben conservades en nounats

humans, primats i rates (Berridge, 2003). És el què ells consideren la manifestació del *liking*, és a dir, del plaer en sentit estricte que origina el consum d'un estimul gratificant, de forma que hom pot analitzar el plaer induït per una solució endolcida si és capaç de quantificar les expressions facials d'hedònia. Aquest grup ha descobert que al shell medial del nucli accumbens existeixen el què han anomenat "punts calents" (*hot spots*), regions molt concretes a les què la microinjecció d'agonistes opioidèrgics incrementa la reacció de plaer induïda en rates pel sabor dolç (Peciña i Berridge, 2005). També han observat que si bé la injecció d'agonistes opioidèrgics en altres regions de l'estriat ventral pot produir un increment en el *wanting*, és a dir, en la motivació per consumir sacarosa, aquest no va lligat a un increment en el plaer que origina el consum de sacarosa.

Aquests resultats, junt amb els nostres propis, ens fa proposar que podria haver una regionalització a l'estriat ventral, de forma que podrien existir "punts calents" que codificaren de manera específica el valor recompensant d'estímuls reforçants de distintes modalitats sensorials.

Com ja hem comentat prèviament, el comportament investigador preferent que les femelles manifesten cap a les feromones sexuals de mascle pot ser considerat una manifestació del "plaer" (*liking*) que els

suposa el detectar-les, de manera equivalent a com les expressions facials de les rates ho són del plaer que produeix el sabor dolç (veure discussió a Agustín-Pavón et al., 2007). Així, tant els experiments d'expressió de c-fos als illots de Calleja que comprèn el Capítol 3 d'aquesta tesi com els de lesió d'aquest nucli realitzats per Carmen Agustín ja explicats anteriorment, apunten que els illots de Calleja medials (i en concret el ventromedial) i regions adjacents de l'estriat ventral que inclourien parts del tubercle olfactiu i alguns dels ponts cel·lulars, podrien constituir el "punt calent" que mitjança el valor hedònic de les feromones sexuals.

L'existència de diferents microcircuitos del plaer podria estar relacionada amb les característiques concretes de cada estímul. Per exemple, el grup de Berridge (Smith i Berridge, 2005b) ha caracteritzat un punt calent al *pàlid* ventral, al qual la microinjecció d'agonistes d'opioides incrementa el *liking*. Les neurones d'aquesta regió augmenten la seua resposta front a un estímul dolç (Smith et al., 2004; Tindell et al., 2004; 2005; 2006). Quan els animals consumeixen una solució salina molt concentrada, que produeix reaccions facials de fàstic, les neurones d'aquest punt calent no s'activen (Tindell et al., 2004; 2006). Però quan la concentració salina en sang dels animals es disminuïda exògenament, aquest mateix sabor salat evoca reaccions facials de plaer i les neurones

d'aquest punt calent s'activen (Smith et al., 2004; Tindell et al., 2006). Per tant aquesta regió processa el valor hedònic del sabors dolç i salat de manera integrada amb senyals fisiològiques que assegurin un balanç homeostàtic correcte (Smith et al., 2004; Tindell et al., 2006).

El "consum" de les feromones sexuals no estaria sotmès a un procés de regulació homeostàtica com el que actua sobre el consum de menjar o aigua, de manera que l'activitat dels punts calents que codificaren el valor plaent d'aquest estímul no caldria que estigués integrada amb els circuits responsables de mantenir l'equilibri homeostàtic. Aquesta podria ser la raó que justificara l'existència de microcircuits diferents dins de l'estriat ventral que codificaren el valor plaent d'estímuls distints amb diferents condicionants fisiològics.

4.6 LA HIPÒTESI DUAL OLFACTIVA: IDENTIFICAR FRONT A RECONÈIXER

La presència de dos sistemes olfactivs amb diferents òrgans sensorials i circuits neurals en la majoria dels tetràpods (Eisthen, 1997; Scalia i Winans, 1975) planteja la qüestió de si aquests tenen funcions redundants o, pel contrari, les seues funcions són complementàries. Recentment sembla que s'ha arribat a un consens que diu que els dos juguen papers complementaris en mitjançar les

respostes comportamentals front a senyals de naturalesa química (Brennan i Peele, 2003; Restrepo et al., 2004; Kelliher, 2007; Zufall i Leinders-Zufall, 2007). De fet, algunes molècules són detectades tant pel sistema olfactiu com pel vomeronasal (Xu et al., 2005). Però no existeix consens sobre quines serien estes funcions dels sistemes olfactiu i vomeronasal, i com estan inter-relacionades. Les nostres dades i les d'altres autors ens porten a suggerir que els dos sistemes juguen papers diferents i complementaris: el sistema vomeronasal sembla mitjançar la *identificació* (conèixer la identitat química) d'un número reduït de molècules biològicament rellevants, mentre que el sistema olfactiu permet el *reconeixement* de mescles de molècules volàtils (olors) amb els quals l'animal ha tingut experiència prèviament (per això l'ús del terme *re-coneixement*). El sistema olfactiu també permet la detecció (sense experiència prèvia) de moltes molècules sense rellevància biològica, el què permet aprendre de l'experiència.

Dins el context de l'atracció intersexual, aquesta qüestió pot ser plantejada de la següent forma: el sistema vomeronasal s'encarregaria de la identificació del gènere dels conespecífics, mentre que el sistema olfactiu permetria el reconeixement de les marques de mascles o femelles individuals i facilitaria la cerca o l'evitació d'aquests individus.

Les neurones de l'òrgan vomeronasal expressen un sol receptor (Mombaerts, 2004), bé dels anomenats tipus 1 (VR1, de l'anglès *vomeronasal receptor 1*) bé del tipus 2 (VR2). Els receptors vomeronasals uneixen un únic (o molt pocs Bosch et al., 2002; Leinders-Zufall et al., 2004) lligands de manera molt específica, cap als quals mostren una gran afinitat. Per tant, aquestes neurones responen de manera ultrasensible i extremadament específica (Leinders-Zufall et al., 2000) a la presència a l'entorn d'un número de molècules per a les quals tenen receptors. Tot açò suggereix que el sistema vomeronasal està organitzat d'acord amb el què s'anomena codi de "línia marcada". La identitat i la concentració de la molècula detectada són codificades al receptor, sense necessitat d'un processat posterior a nivells centrals. Açò permet la identificació dels lligands sense que calga experiència prèvia amb ells, la qual cosa és molt útil per a mitjançar el desencadenament de respostes pre-programades, no apreses cap a molècules específiques com les feromones.

Pel contrari, les neurones olfactives expressen un únic receptor d'una gran família de receptors (OR, de l'anglès *olfactory receptors*, Mombaerts, 2004) o receptors *trace-amine* (TAARs, de l'anglès *trace amine-associated receptors*, Liberles i Buck, 2006). En comparació amb els receptors vomeronasals, els olfactius són generalistes i molt

menys sensibles. Açò es pot observar si hom compara la resposta de les neurones vomeronasals (Zufall et al., 2002) amb la de les olfactives (Spehr et al., 2006) cap al mateix tipus de molècula (com per exemple els pèptid derivats de MHC I). A més a més, els receptors olfactivus uneixen vàries molècules distintes amb diferents afinitats. Com a conseqüència, una concentració baixa d'una determinada olor activa un número reduït de receptors. Però a mesura que la concentració s'incrementa, també augmenta el número de receptors diferents que s'activen. Per tant, ni la identitat ni la concentració d'una determinada molècula pot ser deduïda de l'activitat d'una neurona en concret, sinó que està codificada per l'activitat conjunta de tota la població de receptors (Malnic et al., 1999). Açò explica el caràcter sintètic de la percepció olfactiva, és a dir, que distintes mescles de molècules volàtils són detectades com a olors particulars diferents dels components concrets que les formen (Zou i Buck, 2006). Com a conseqüència, el disseny dels sistema olfactivu no sembla apropiat per identificar una olor o una mescla d'olors en la primera experiència amb ell, però sí per a reconèixer patrons d'activitat induïts per aquestes olors en experiències passades amb ells. Per tant, les reaccions cap a la majoria d'olors no serien pre-programades (innates o no apreses).

Malgrat tot això, aquestes propietats fan el sistema olfactiu extremadament versàtil, i capaç de detectar i reconèixer desenes de milers d'olors diferents amb un número reduït de receptors. La idea que els receptors vomeronasals estan dissenyats per a detectar un espectre menut de molècules concretes, mentre que els receptors olfactius són generalistes, es veu recolzada pel fet que els receptors olfactius estan molt conservats al llarg de l'evolució, mentre que els receptors vomeronasals són més específics de llinatge (Grus i Zhang, 2008).

Una altra diferència molt important entre els dos sistemes és la volatilitat dels lligands que detecta cadascun d'ells i, per tant, la distància des de la qual pot tenir lloc aquesta detecció. Com ja hem explicat anteriorment, als vertebrats terrestres la detecció d'estímuls vomeronasals requereix del contacte directe amb la font de l'estímul (les nostres dades, Luo et al., 2003), mentre que el sistema olfactiu principal detecta olors (volàtils) des de la distància. La idea que els estímuls vomeronasals són molècules no volàtils (Luo et al., 2003; Moncho-Bogani et al., 2002; Wysocki et al., 1982) ha estat testada per experiments *in vitro* que han mostrat que els receptors de les neurones vomeronasals responen a volàtils de l'orina (Boschat et al., 2002; Leinders-Zufall et al., 2000) i fins i tot a volàtils d'origen sintètic (Sam et al., 2001). Però és molt important destacar que

aquestes respostes no s'han pogut registrar *in vivo* (Luo et al., 2003). A més, recentment s'ha demostrat que a l'epiteli vomeronasal algunes neurones coexpressen un receptor olfactiu amb el receptor de tipus V1R (Lévai et al., 2006). Aquests receptors olfactius poden ser responsables de l'activació amb volàtils sintètics que mostraren Sam et al. (2001). Per tant, sembla que els volàtils que poden activar les neurones vomeronasals no poden arribar a l'epiteli vomeronasal sense contacte directe amb la font de l'estímul. En el cas dels volàtils de l'orina que poden activar les neurones vomeronasals, és molt probable que arriben fins elles formant complexos amb MUPs, les quals tenen, com ja hem explicat anteriorment, una butxaca lipofílica que uneix volàtils de l'orina amb acció feromonal amb gran afinitat (Beynon et al., 2004). Hi ha diferents línies d'evidència que suggereixen que en aquests complexos MUP-volàtil les proteïnes no solament jugarien un paper com a transportadors, sinó que són senyals biològicament rellevants de per si (Brennan i Peele, 2003; Chamero et al., 2007, Hurst et al., 2001). Per tant, aquests complexos MUP-volàtil constitueixen fermes candidats per a ser les feromones que es detecten a través del sistema vomeronasal.

Les fonts de molècules oloroses constitueixen estímuls potencialment atractius o amenaçadors, que per tant poden ser investigats i exercir atracció (és a dir, induir que l'animal es dirigisca a favor del gradient

de concentració d'aquest estímul) o evitats (i per tant originar que l'animal no es moga o ho faça en direcció contrària al gradient de concentració de l'estímul). Així, per a la majoria de rosegadors, els estímuls olorosos són cridaners i indueixen una investigació molt intensa (els tests d'habitució-deshabitució o de la funció olfactiva es basen en aquest fet; Gregg i Thiessen, 1981). De fet, els rosegadors tendeixen a investigar senyals químics de conespecífics del mateix (Martinez-Ricos et al., 2007) o del gènere contrari (Martinez-Ricos et al., 2007; Nyby et al., 1985; Pankevich et al., 2006) i fins i tot de conespecífics castrats o olors sintètiques (Martinez-Ricos et al., 2007), quan són confrontades a aire pur (Nyby et al., 1985), borumballa neta (Martinez-Ricos et al., 2007) o aigua (Pankevich et al., 2006) en tests d'elecció simple. En canvi, els animals anòsmics rarament investiguen objectes o fins i tot els conespecífics (Mandiyani et al., 2005).

Aquestes observacions, junt amb les nostres dades i les d'altres autors, ens porten a refinar la hipòtesi olfactiva dual per tal d'explicar millor la forma en què els sistemes olfactiv i vomeronasal treballen conjuntament, de forma complementària. El sistema vomeronasal detecta un conjunt de substàncies per a les quals existeixen receptors específics i mitjança les respostes emocionals incondicionades cap a elles. Açò inclou no solament l'atracció cap a

feromones sexuals, sinó, molt probablement, també les respostes de por que les rates mostren cap a un collar prèviament fet servir per un gat. Aquestes respostes de por s'observen solament si a les rates se les permet contactar amb el collar, però no quan s'aplica una reixeta perforada que separa físicament les rates del collar (Dielenberg i McGregor, 2001). A més, l'exploració d'un collar de gat per les rates incrementa significativament l'expressió de c-fos a l'amígdala medial posteroventral en comparació a l'activació que genera l'exposició de les rates a un collar que no ha estat en contacte amb cap gat (Dielenberg et al., 2001). Siga quina siga la raó (la no volatilitat de la majoria de les molècules detectades per l'OVN, la falta de corrent d'aire a través de l'epiteli vomeronasal i la necessitat de mecanismes de bombeig per tal de detectar aquestes substàncies cal fer contacte directe amb elles. Per tant, l'animal ha d'estar constantment bombejant molècules a l'interior del seu VNO o podria no percebre estímuls de gran rellevància. El sistema olfatiu principal juga un paper molt important en aquest context, ja que indueix l'activació del bombeig vomeronasal i que, per tant, puguen iniciar-se les respostes dependents de la detecció de senyals vomeronasal. Aquest procés pot ser resumit en el següent esquema.

1. Detecció de volàtils a través del sistema olfactiu principal, que no originen una resposta comportamental concreta. L'animal no els atribueix un significat.
2. La detecció de determinats volàtils indueix l'activació del bombeig vomeronasal i, per tant, la detecció dels estímuls vomeronasals no volàtils que estigueren presents.
3. A continuació té lloc la identificació dels estímuls vomeronasals.
4. I, en conseqüència, es porta a terme la resposta comportamental adequada.
5. Durant aquest procés pot tenir lloc un aprenentatge associatiu a través del qual l'animal relacione l'estímul volàtil detectat en primera instància i el senyal no volàtil detectat a través de l'òrgan vomeronasal i que ha desencadenat la resposta comportamental en qüestió.
6. A partir d'aquest moment l'animal podrà expressar respostes condicionades als volàtils associats amb els senyals vomeronasals, que ara són reconeguts i se'ls atribueix un significat.

Aquest sistema és capaç de detectar una gran varietat de molècules de moltes classes. La detecció de totes aquestes molècules indueix formes d'investigació que inclouen bombeig vomeronasal i exploració

tàctil a través de les vibrisses (veure discussió del Capítol 1). La majoria dels objectes biològicament interessants (presses, predadors o conespecífics, o les seues marques a l'entorn) són fonts importants tant d'olors com de molècules no volàtils detectades a través del sistema vomeronasal. Açò assegura la identificació de la font per mitjà de la seua olor, donat que l'animal ha tingut experiència prèvia amb marques (orina, excrements), a través de la qual ha tingut lloc l'associació vomeronasal-olfactiva.

La majoria dels volàtils (olors detectades a través de l'epiteli olfactivu) no poden ser identificats en el primer contacte amb els mateixos, degut a la natura generalista dels receptors olfactivus, però indueix un patró d'activitat en el sistema que pot ser reconegut en encontres successius amb la mateixa olor. Si s'associa amb un estímul vomeronasal concret, aquest patró induirà les respostes emocionals condicionades (com per exemple atracció cap a l'olor d'una possible parella sexual o por cap a olors de predadors), que permeten anticipar reaccions, la qual cosa té un gran valor adaptatiu.

Malgrat açò, s'han descrit algunes excepcions a aquesta regla. La feromona mamària (Hudson i Distel, 1986; Schaal et al., 2003) es detectada per l'epiteli olfactivu dels conills recent nascuts i indueix la cerca del mugró. A més, s'ha trobat un conjunt de cèl·lules mitrals del bulb olfactivu principal que responen de manera exclusiva a una

molècula (methylthiol)metanethial) present en l'orina de mascle (Lin et al., 2005), el què suggereix que es detectada per un receptor específic. Finalment, cal comentar que recentment s'han descrit les reaccions innates cap a l'orina de possibles predadors dependents del sistema olfatiu (Kobayakawa et al., 2007). Açò indicaria que algunes neurones olfatives expressen receptors olfatius especials que estan dissenyats per detectar de manera específica feromones o al·lomones concretes. Els receptors de la subfamília TAAR6-9, als quals es dóna una conservació dependent de llinatge similar a la dels VR1 i VR2, semblen bons candidats a ser responsables d'alguns d'aquests fenòmens.

Per últim, cal discutir una qüestió de gran rellevància quan s'estudia el paper relatiu dels sistemes olfatiu i vomeronasal en el reconeixement de gènere. Aquesta és la necessitat de diferenciar entre l'habilitat de *detectar* i *discriminar* senyals procedents de conespècífics del fenomen de *reconeixement* o *identificació* d'una molècula i el seu significat en termes biològics. Per exemple, l'habilitat de les femelles amb el BOA lesionat per a detectar olors de mascle i discriminar-los dels de femelles o de mascles castrats i d'olors sintètiques (els nostres resultats; Keller et al., 2006; Pankevich et al., 2004) s'interpreta moltes vegades com una demostració de que les femelles són capaces d'identificar o reconèixer

el gènere dels conespecífics. Ben al contrari, el que indiquen aquestes dades és que, malgrat que són capaços de detectar diferents olors a través del sistema olfatiu, donat que aquests animals no prefereixen unes front a altres, no estan identificant el gènere del subjecte responsable d'aquesta marca.

Els nostres experiments són un altre exemple d'animals que poden detectar i discriminar olors de distints conespecífics però això no vol dir que estiguen identificant el seu gènere, ja que no mostren el comportament dependent de gènere corresponent (preferència en aquest cas). Solament quan els animals tenen accés directe, és a dir, quan poden detectar senyals a través del sistema vomeronasal és quan identifiquen el gènere.

4.7 LES FEROMONES SEXUALS: UN NOU ESTÍMUL REFORÇANT NATURAL

Els mecanismes d'aprenentatge associatiu i les vies del reforç constitueixen un camp d'estudi molt important, tant per la seua implicació en els processos d'addicció a drogues, com pels processos d'aprenentatge emocional que es donen relacionats amb la consecució de recompenses.

Com ja hem discutit, els reforçants naturals que han estat objecte d'estudi experimental fins al moment són els relacionats amb el menjar i el beure, els sabors i el sexe. En aquesta tesi hem demostrat

que, a més de les estimulacions somatosensorials genitals i d'altres parts dels cos pròpies de la còpula, de les quals s'ha demostrat el seu valor reforçant, les feromones sexuals constitueixen un estímul vomeronasal que contribueix al reforç del sexe i a la atracció sexual. A més, els dos tests comportamentals utilitzats al llarg de la tesi, el test d'elecció simple i el test d'adquisició de preferència condicionada modificat per nosaltres, han demostrat ser eines molt útils per l'anàlisi de les propietats reforçants d'aquest estímul. Per tant, del nostre treball se'n deriva un nou model experimental que ha demostrat ser molt útil per l'estudi de les vies i els mecanismes neurals del reforç (veure altres treballs del grup: Moncho-Bogani et al., 2005; Agustín-Pavón et al., 2007 i 2008; Martínez-Hernández et al., 2006). Aquest model presenta avantatges front als models utilitzats fins el moment. Tant el test d'elecció simple com el de preferència condicionada de lloc són tests molt senzills, donat que no requereixen d'aparells complexos ni d'observadors especialment entrenats (com per exemple el test de la hedònia mitjançant l'avaluació de l'expressivitat facial). A més, l'obtenció dels estímuls, la borumballa embrutada per conespecífics, també és molt senzilla (veure material i mètodes). D'altra banda, sabem que les feromones sexuals són detectades a través de l'òrgan vomeronasal (capítol 1; Martínez-Ricós et al., 2008), i que els tests no requereixen de

privació prèvia per observar el comportament, donat que no presenten mecanismes de saciat immediats (no mostren habituació; veure resultats capítol 1). Per tot això l'ús d'aquest model comportamental apareix com una bona alternativa front als paradigmes operants clàssics en l'estudi dels mecanismes del plaer.

4.8 FEROMONES EN HUMANS

Tant els nostres resultats, com els d'altres, que indiquen l'existència de feromones en rosegadors, plantegen la qüestió de si en humans la comunicació intraespecífica podria estar basada, almenys en part, en la detecció de feromones de congèneres. Malgrat que l'espècie humana té un sistema olfatiu molt reduït en comparació amb els rosegadors, i que la identificació i el reconeixement de les possibles parelles sexuals semblaria basar-se fonamentalment en estímuls de naturalesa visual i auditiva, hi ha la possibilitat de que, tot i això, les secrecions juguen un paper (menor) en la comunicació humana, tot i que ho facen per sota de la consciència.

Pel que fa a les feromones desencadenants, les que provoquen canvis comportamentals immediats, com ara l'atracció sexual, l'evidència és nul·la. Si bé hi ha indicis de que hom pot reconèixer el gènere d'una persona a partir de la seua olor personal (veure Lenochova i Havlicek, 2008), això pot ser resultat de l'experiència prèvia i, per tant, no és demostratiu de l'existència de feromones sexuals o d'altra

mena. Hi ha un exemple, però, on s'ha trobat una resposta comportamental detectable en bebès de solament unes poques setmanes, i que, per tant podrien ser innates o incondicionades. Aparentment, els bebès poden identificar, i es senten atrets, per les olors axil·lars (Cernock i Porter, 1985) i dels pits (Varendi i Porter, 2001) de la seua mare, front a olors semblants d'altres dones, la qual cosa suggereix un mecanisme per al reconeixement del parentesc en humans basat en senyals químics. Però, fins i tot en aquests casos, és improbable que les molècules responsables d'aquestes olors no siguin feromones. Al llarg dels primeres dies de vida, el bebè té nombroses experiències gratificants (entre elles l'al·letament) que pot estar associat amb l'olor de sa mare.

Queda, per tant, com a única possibilitat l'existència de feromones preparadores, que generen respostes de caràcter fisiològic, endocrí o del desenvolupament relativament lentes. En aquest sentit, hi ha dos exemples a la literatura científica a què hem tingut accés.

Entre els estudis més coneguts sobre l'existència de feromones en humans estan aquells que han analitzat l'acoblament del cicle sexual entre dones degut a la possible detecció de senyals químiques d'altres dones, fenomen descrit per Martha K. McClintock en la dècada dels '70 (McClintock, 1971). Alguns d'aquests estudis indiquen que certes secrecions axil·lars de dones que no són oloroses

(és a dir, no són percebudes de manera conscient com una olor), indueixen alteracions en el cicle menstrual en altres dones (Stern i McClintock, 1998). Les secrecions de dones que estan en la fase fol·licular acurten el cicle menstrual de dones receptores. Pel contrari, les secrecions produïdes per les mateixes donants, però recollides quan aquestes estan en la fase ovulatòria, tenen un efecte oposat sobre altres dones en allargar el seu cicle menstrual (Stern i McClintock, 1998). D'acord amb els autors, aquests dos efectes "feromonal" explicarien l'acoblament del cicle menstrual de les dones que conviuen, d'acord amb el model del doble oscil·lador (Schank i McClintock, 1992)

Però hi ha altres treballs que mostren resultats negatius sobre l'acoblament del cicle menstrual, tant en rates (Schkank, 2001) com en dones (Yang i Schank, 2006; Schank JC, 2001) i que indiquen que els resultats positius obtinguts als altres estudis es deurién a errades en la metodologia estadística feta servir en aquests treballs (Schank J, 2001). Fins i tot sembla que, a nivell evolutiu, la sincronia del cicle menstrual entre femelles que viuen juntes no és convenient (Schank J, 2004), el que també qüestiona l'existència d'aquest fenomen. Per tant, donat que continua sent un debat obert si el fenomen de sincronització del cicle menstrual entre dones

existeix (Wilson et al., 1991), encara ho és més que aquest ocorrega com a conseqüència de la detecció d'una possible feromona.

Un altre exemple de possible feromona preparadora a la nostra espècie és la 4,16-androstadien-3-ona (Wyart et al., 2007), que ha estat identificada com un component de la suor dels homes (mascles) i que manté els nivells de cortisol en dones significativament per damunt dels nivells normals. En aquest treball, totes les dones estudiades havien tingut experiència prèvia amb homes, per tant caldria comprovar si la resposta fisiològica front a la detecció de la 4,16-androstadien-3-ona podria ser condicionada a la percepció d'un altre estímul (fins i tot no químic) que sí tinguera rellevància biològica per si mateix, amb la qual cosa, la 4,16-androstadien-3-ona no podria ser considerada una feromona.

Com a consideració general, i com ja hem discutit abastament al llarg d'aquesta tesi, perquè una substància pugui ser considerada una feromona és requisit imprescindible que la resposta que genere en l'individu que la percep siga incondicionada i no apresada. Per tant, és fonamental controlar l'experiència prèvia dels individus amb estímuls intrínscament significatius, als què el senyal químic en qüestió podria estar associat. La única manera d'aconseguir controlar l'experiència prèvia d'un individu adult per analitzar l'efecte de possibles feromones de caire sexual és privar-lo des del naixement

del contacte amb congèneres de l'altre sexe, com férem nosaltres amb les femelles de ratolí (químicament verges). Per raons obviades en humans això no és factible i, per tant, resulta molt difícil, si no impossible, comprovar el valor com a feromones sexuals de cap substància secretada per homes i dones.

En qualsevol cas, si en humans existiren les feromones sexuals caldria estudiar quin és el sistema quimiosensorial responsable de la seua detecció. Si ens basàrem en els estudis en altres animals (com ara les nostres dades), aquests senyals haurien de ser detectats per l'òrgan vomeronasal. Però en humans, només hi ha un òrgan vomeronasal anatòmicament identificable (tot i que hi ha dubtes al respecte) en uns pocs individus (Smith et al., 1998), i mai s'ha descrit un bulb olfactiu accessori (Boehm et al., 1994; Meisami i Bhatnagar, 1998). Per tant sembla que, si existeix, l'òrgan vomeronasal no és funcional (Doty, 2001). De fet, els gens que codifiquen per als receptors vomeronasals, sobretot de la família dels VR2 (Young i Trask, 2007), són pseudogens en humans (Mombaerts, 2001) i el canal TRPC2, fonamental per la transducció de senyal a l'òrgan vomeronasal, no s'expressa a l'adult (Liman i Innan, 2003). Una possibilitat seria que en humans el sistema vomeronasal haguera estat "absorbit" per l'olfactiu, donat que s'han trobat transcrits del receptor VR1L1 en la mucosa olfactiva (Rodriguez et

al., 2000). Així, hi ha autors que suggereixen que les feromones en humans serien senyals de naturalesa volàtil, detectades per receptors específics, de naturalesa similar o igual als trobats a l'òrgan vomeronasal d'altres espècies que estarien localitzats a la mucosa olfactiva (Trotier et al., 2000). Però la realitat és que no hi ha proves de l'existència de feromones en humans, fonamentalment perquè els estudis sobre aquest tema no tenen en compte l'experiència prèvia dels individus, factor que, com ja hem explicat, és essencial. D'altra banda, com que als humans el sistema olfactivu està significativament menys desenvolupat que el visual o l'auditiu, i el vomeronasal sembla inexistent, sembla una hipòtesi més plausible que malgrat que les vies que medien l'atracció foren les mateixes en humans i rosegadors (Meyer et al., 1989) els estímuls responsables de mediar aquesta atracció foren de naturalesa no química, sinó visuals o auditius, quedant el paper de les feromones en la comunicació intersexual molt relegat.

No volem acabar aquesta discussió sense fer esment de les feromones mamàries. En conills s'ha demostrat l'existència d'una feromona mamària olfactiva (no vomeronasal), que guia els cadells cap al mugró de la mare, l'efecte de la qual és independent de l'experiència prèvia (Hudson i Distel, 1986; Schaal et al., 2003). Benoist Schaal ha proposat recentment la possibilitat de què una

feromona mamària semblant estiga present en humans (Schaal et al., 2006).

Capítol 5:

**CONCLUSIONS DE LA
TESI**

1. Els mascles de ratolí produeixen, de forma dependent de la testosterona, substàncies no volàtils que resulten innatament atractives per a les femelles. Es tracta, per tant, d'autèntiques feromones sexuals.
2. Les feromones sexuals masculines de ratolí són detectades per les femelles a través de l'òrgan vomeronasal.
3. Els volàtils continguts en la borumballa embrutada per mascles no són atractius per a femelles químicament verges, és a dir, sense experiència prèvia amb senyals químiques de mascles adults.
4. Els volàtils de mascle poden esdevenir atractius de manera secundària en ser associats a les feromones sexuals masculines (no volàtils i detectades per l'òrgan vomeronasal).
5. Les feromones sexuals masculines tenen propietats reforçants per a les femelles de ratolí, ja que aquestes desenvolupen preferència condicionada per un lloc on la borumballa embrutada per mascles se'ls presenta com a premi.
6. Els senyals químics d'altres femelles o de mascles castrats no tenen propietats reforçants per a les femelles de ratolí, ja

que la seua detecció no indueix preferència condicionada de lloc.

7. L'exploració i detecció de les feromones sexuals masculines contingudes a la borumballa embrutada per mascles intactes activa els illots de Calleja ventromedials, el nucli posteromedial de l'amígdala cortical i l'àrea amigdalo-hipocàmica de les femelles. Aquesta activació està correlacionada amb el temps d'exploració de la borumballa.
8. Els illots de Calleja laterals semblen estar implicats en la detecció de volàtils de mascle, donat que són activats parcialment per l'exploració de la borumballa embrutada per mascles, però aquesta activació no mostra correlació amb el temps d'exploració.
9. Els resultats de l'expressió de c-fos relatius a l'illot de Calleja Magne són contradictoris. No s'activa significativament com a conseqüència de l'exploració de borumballa embrutada per mascles, però l'activitat està correlacionada amb el temps d'exploració.
10. El còrtex vomeronasal de les femelles, incloent-hi el nucli posteromedial de l'amígdala cortical i l'àrea amigdalo-hipocàmica, i l'illot de Calleja ventromedial, formen un

sistema funcional, donat que la seua activitat està correlacionada.

BIBLIOGRAFIA

- Adey WR (1953) An experimental study of the central olfactory connexions in a marsupial (*Trichosurus vulpecula*). *Brain*. 76:311-330.
- Afonso VM, Pfaus JG (2006) Hormonal and experiential control of female-male mounting in the female rat. *Horm Behav*. ;49(1):30-7.
- Agmo A (1999) Sexual motivation--an inquiry into events determining the occurrence of sexual behavior. *Behav Brain Res*. 105(1):129-50. Review
- Agmo A, Berenfeld R (1990) Reinforcing properties of ejaculation in the male rat: role of opioids and dopamine. *Behav Neurosci*. 104(1):17:82.
- Agmo A, Federman I, Navarro V, Padua M, Velazquez G (1993) Reward and reinforcement produced by drinking water: role of opioids and dopamine receptor subtypes. *Pharmacol Biochem Behav*. 46(1):183-94.
- Agmo A, Gomez M (1993) Sexual reinforcement is blocked by infusion of naloxone into medial preoptic area. *Behav Neurosci*. 107(5):812:8.

- Agustin- Pavon C. (2008) Neuroquímica del refuerzo inducido por feromonas. *Tesis Doctoral. Universitat de València.*
- Agustin-Pavon C, Martinez-Ricos J, Martinez-Garcia F, Lanuza E (2007) Effects of dopaminergic drugs on innate pheromone-mediated reward in female mice: a new case of dopamine-independent "liking". *Behav Neurosci.* 121(5):920-32.
- Albers HE, Huhman KL, Meisel RL (2002) Hormonal Basis of Social Conflict and Communication. In *Hormones Brain and Behaviour I* (eds. Pfaff DW, Arnold AP, Fahrbach SE, Etgen AM, Rubin RT), pp. 393-433 New York: Academy Press.
- Armstrong SD, Robertson DH, Cheetham SA, Hurst JL, Beynon RJ (2005) Structural and functional differences in isoforms of mouse major urinary proteins: a male-specific protein that preferentially binds a male pheromone. *Biochem J.* 391(Pt 2):343-50.
- Bacchini A, Gaetani E, Cavaggioni A (1992) Pheromone binding proteins of the mouse, *Mus musculus*. *Experientia.* 48(4):419-21.
- Baum MJ, Keverne EB (2002) Sex difference in attraction thresholds for volatile odors from male and estrous female mouse urine. *Horm Behav* 41(2):213-219.

- Baxter MG, Murray EA (2002) The amygdala and reward. *Nat Rev Neurosci.* 3(7):563-73.
- Beauchamp GK, Martin IG, Wellington JL, and Wysocki CJ (1983) The accessory olfactory system: Role in maintenance of chemoinvestigatory behavior. In *Chemical Signals in Vertebrates III.* (eds. Muller-Schwarze D and Silverstein RM), pp. 73-86 New York: Plenum Press.
- Beauchamp GK, Martin IG, Wysocki CJ, and Wellington JL (1982) Chemoinvestigatory and sexual behavior of male guinea pigs following vomeronasal organ removal. *Physiol Behav* 29:329-336.
- Beauchamp GK, Wysocki CJ, and Wellington JL (1985) Extinction of response to urine odor as a consequence of vomeronasal organ removal in male guinea pigs. *Behav Neurosci* 99:950-955.
- Beltramino C, Taleisnik S (1983) Release of LH in the female rat by olfactory stimuli. Effect of the removal of the vomeronasal organs or lesioning of the accessory olfactory bulbs. *Neuroendocrinology.* 36(1):53-8.
- Berridge KC (2000) Measuring hedonic impact in animals and infants: microstructure of affective taste reactivity patterns. *Neurosci Biobehav Rev.* 24(2):173-98.

- Berridge KC (2003) Pleasures of the brain. *Brain Cogn.* 52(1):106-28.
Review.
- Berridge KC, Robinson TE (1998) What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Rev.* 28:309-369.
- Berridge KC, Robinson TE (2003) Parsing reward. *Trends Neurosci.* 26(11):581.
- Berridge KC, Winkielman P (2003) What is an unconscious emotion? (the case for unconscious "liking"). *Cognit Emot.* 17:181-211.
- Beynon RJ, Hurst JL (2004) Urinary proteins and the modulation of chemical scents in mice and rats. *Peptides* 25(9):1553-1563.
- Beynon RJ, Hurst JL, Turton MJ, Robertson DHL, Armstrong SD, Cheetham SA, Simpson D, MacNicol A, Humphries RE (2008) Urinary lipocalins in Rodenta: is there a generic model). In *Chemical Signals in Vertebrates 11* (eds. Hurst JL, Beynon RJ, Roberts SC, Wyatt TD), pp 37-49. New York: Springer.
- Boehm N, Roos J, Gasser B (1994) Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells in the nasal septum of human fetuses. *Dev Brain Res.* 82:172-180.
- Boehm N, Zufall F (2006) MHC peptides and the sensory evaluation of genotype. *Trends Neurosci* 29:100-107.

- Boschat C, Pelofi C, Randin O, Roppolo D, Luscher C, Broillet MC, Rodriguez I (2002) Pheromone detection mediated by a V1r vomeronasal receptor. *Nat Neurosci* 5:1261-1262.
- Brennan PA. (2004) The nose knows who's who: chemosensory individuality and mate recognition in mice. *Horm Behav* 46:231-240.
- Brennan PA, Peele P (2003) Towards an understanding of the pregnancy-blocking urinary chemosignals of mice. *Biochem Soc Trans.* (Pt 1):152-5. Review.
- Brennan PA, Zufall F (2006) Pheromonal communication in vertebrates. *Nature*.444:308-315.
- Broadwell RD (1975) Olfactory relationships of the telencephalon and diencephalon in the rabbit. I. An autoradiographic study of the efferent connections of the main and accessory olfactory bulbs. *J Comp Neurol.* 163(3):329-45.
- Briand L, Huet J, Perez V, Lenoir G, Nespoulous C, Boucher Y, Trotier D, Pernollet JC (2000) Odorant and pheromone binding by aphrodisin, a hamster aphrodisiac protein. *FEBS Lett.* 476(3):179-85.
- Briand L, Nespoulous C, Perez V, Rémy JJ, Huet JC, Pernollet JC (2000) Ligand-binding properties and structural

characterization of a novel rat odorant-binding protein variant. *Eur J Biochem.* 267(10):3079-89.

Briand L, Trotier D, Pernollet JC (2004) Aphrodisin, an aphrodisiac lipocalin secreted in hamster vaginal secretions. *Peptides.* 25(9):1545-52.

Bronson FH (1976) Serum FSH, LH and prolactin in adult ovariectomized mice bearing silastic implants of estradiol: responses to social cues. *Biol Reprod.* 15(2):147-52.

Bruce HM (1960) A block to pregnancy in the mouse caused by proximity of strange males. *J. Reprod. Fertil.* 1:96-103.

Brunet LJ, Gold GH, Ngai J (1996) General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. *Neuron* 17:681-693.

Bubar MJ, Cunningham KA (2006) Serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors as potential targets for modulation of psychostimulant use and dependence. *Curr Top Med Chem.* 6(18):1971-85.

Cador M, Robbins TW, Everitt BJ (1989) Involvement of the amygdala in stimulus-reward associations: interaction with the ventral striatum. *Neuroscience.* 30(1):77-86.

- Cairns RB, Nakelski JS (1971) On fighting in mice: ontogenetic and experiential determinants. *J Comp Physiol Psychol.* 74(3): 354-64.
- Campenhausen H, Mori K (2000) Convergence of segregated pheromonal pathways from the accessory olfactory bulb to the cortex in the mouse. *Eur J Neurosci.*
- Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW (1992) Connections of the posterior nucleus of the amygdala. *J Comp Neurol.* 324(2):143-79. Erratum in: *J Comp Neurol* 1993, 328(4):604.
- Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW (1995) Organization of rojections from the medial nucleus of the amygdale: a PHAL study in the rat. *J Comp Neurol.* 360(2):328-30.
- Carlson N (1991) Reinforcement and addiction. In *Physiology of behaviour* eds. McOscar, Frankenthaler L), pp. 511-538. Allyn and Bacon.
- Carr WJ, Loeb LS, Dissinger ME (1965) Responses of rats to sex odors. *J Comp Physiol Psychol.* 59:370-377.
- Carr WJ, Yee L, Gable D, Marasco E (1976) Olfactory recognition of conspecifics by domestic Norway rats. *J Comp Physichol.* 90:821-828.

- Cavaggioni A, Mucignat-Caretta C (2000) Major urinary proteins, alpha(2U)-globulins and aphrodisin. *Biochim Biophys Acta* 1482:218-228.
- Cernoch JM, Porter RH (1985) Recognition of maternal axillary odors by infants. *Child Dev.* 56(6):1593-8.
- Chamero P, Marton TF, Logan DW, Flanagan K, Cruz JR, Saghatelian A, Cravatt BF, Stowers L (2007) Identification of protein pheromones that promote aggressive behaviour. *Nature* 6:899-902.
- Cheeta S, Broekkamp C, Willner P (1994) Stereospecific reversal of stress-induced anhedonia by mianserin and its (+)-enantiomer. *Psychopharmacology (Berl)*. 116(4):523-8.
- Cheetham SA, Thom MD, Jury F, Ollier WE, Beynon RJ, Hurst JL (2007) The Genetic Basis of Individual-Recognition Signals in the Mouse. *Curr Biol* 17:1771-1777.
- Chiba, T (2000) Collateral projection from the amygdalo--hippocampal transition area and CA1 to the hypothalamus and medial prefrontal cortex in the rat. *Neurosci Res.*38:373-383.
- Clancy AN, Macrides F, Singer AG, Agosta WC (1984) Male hamster copulatory responses to a high molecular weight fraction of

vaginal discharge: effects of vomeronasal organ removal.
Physiol Behav 33:653-660.

Coolen LM, Peters HJ, Veening JG (1996) Fos immunoreactivity in the rat brain following consummatory elements of sexual behavior: a sex comparison. *Brain Res.* 738(1):67-82.

Coppola DM and O'Connell RJ (1988) Are pheromones their own reward? *Physiol Behav* 44:811-816.

Cornwell CA (1976) Selective olfactory exposure alters social and plant odor preferences of immatures hamsters. *Behav Biol.* 17(1):131-7.

Coureaud G, Schaal B (2008) Psychobiological functions of the mammary pheromone in newborn rabbits. In: *Chemical Signals in Vertebrates* 11 (Hurst JL, Beynon RJ, Roberts SC, Wyatt TD, eds), pp 305-313 Chester: Springer-Verlag.

Cowles, R. B, Phelan (1958) Olfaction in rattlesnakes. *Copeia* 77-83.

Crowder WF, Hutto CW Jr (1992) Operant place conditioning measures examined using morphine reinforcement. *Pharmacol Biochem Behavi.* 41(4):825-35.

Crowcroft P, Rowe FP (1963) Social organization and territorial behaviour in the wild house mouse (*Mus musculus*). *Proc. zool. Soc. Lond.* 140, pp. 517-531.

- Cutler WB, Preti G, Krieger A, Huggins GR, Garcia CR, Lawley HJ (1986) Human axillary secretions influence women's menstrual cycles: the role of donor extract from men. *Horm Behav.* 20(4):463-73.
- Dahlström A, Fuxe K (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia.* 20(7):398-9.
- Davis BJ, Macrides F, Young WM, Scheiner SP, Rosene DI (1978) Efferents and centrifugal afferents of the main and accessory olfactory bulbs in the hamster. *Brain Research Bulletin.* 3:59-72.
- Del Punta K, Leinders-Zufall T, Rodriguez I, Jukam D, Wysocki CJ, Ogawa S, Zufall F, and Mombaerts P (2002) Deficient pheromone responses in mice lacking a cluster of vomeronasal receptor genes. *Nature* 419:70-74.
- de Vente J, Hani L, Steinbusch HE, Steinbusch HW. (2001) The three dimensional structure of the islands of Calleja: a single heterogeneous cell complex. *Neuroreport.* 12(3):565-8.
- Devor M (1976) Fiber trajectories of olfactory bulb efferents in the hamster. *The journal of comparative Neurology.* 166:31-47.
- Di Chiara G, Imperato A (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in

the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci.* 85(14):5274.

Di Chiara G, Tanda G (1997) Blunting of reactivity of dopamine transmission to palatable food: a biochemical marker of anhedonia in the CMS model? *Psychopharmacology.* 134(4):351-3.

Dielenberg RA, Hunt GE, McGregor IS (2001) "When a rat smells a cat": the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. *Neuroscience.* 2001;104(4):1085-97.

Dielenberg RA, McGregor IS (2001) Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. *Neurosci Biobehav Rev.* 25(7-8):597-609. Review.

Distel H, Hudson R (1985) The contribution of the olfactory and tactile modalities to the nipple-search behaviour of newborn rabbits *J Comp Physiol [A].* 57:599-605.

Dong HW, Swanson LW (2004a) Organization of axonal projections from the anterolateral area of the bed nuclei of the stria terminalis. *J Comp Neurol.*;468(2):277-98.

Dong HW, Swanson LW (2004b) Projections from bed nuclei of the stria terminalis, posterior division: implications for cerebral

hemisphere regulation of defensive and reproductive behaviors. *J Comp Neurol.* 474(4):603-4.

Doty RL (2003) Mammalian pheromones: fact or fantasy? *In Handbook of olfaction and Gustation* (eds. Marcel Dekker Inc) pp.345-38 Informa Health Care.

Doty RL, Dunbar I (1974) Attraction of beagles to conspecific urine, vaginal and anal secretions odors. *Physiol. Psychol.* 59:370-377.

Drickamer LC (1977) Delay of sexual maturation in female house mice by exposure to grouped females or urine from grouped females. *J Reprod Fertil.* 51(1):77-81.

Drickamer LC (1989) Odor preferences of wild stock female house mice (*Mus Domesticus*) tested at 3 ages using urine and other cues from conspecific males and females. *J Chem Ecol* 15:1971-1987.

Dulac C, Torello AT (2003) Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. *Nat Rev Neurosci* 4:551-62.

Edwards DA (1970) Induction of estrus in female mice, estrogen-progesterone interactions. *Horm Behav.* 1:299-304.

Edwards DA, Burge KG (1973) Olfactory control of the sexual behavior of male and female mice. *Physiol Behav* 11:867-72.

- Eisthen HL (1997) Evolution of vertebrate olfactory systems. *Brain Behav Evol.* 50(4):222-33.
- Eklund AC, Belchak MM, Lapidos K, Raha-Chowdhury R, Ober C. (2000) Polymorphisms in the HLA-linked olfactory receptor genes in the Hutterites. *Hum Immunol.* 61(7):711-7.
- Everitt BJ, Cador M, Robbins TW (1989) Interactions between the amygdala and ventral striatum in stimulus-reward associations: studies using a second-order schedule of sexual reinforcement. *Neuroscience.* 30(1):63-75.
- Everitt BJ, Morris KA, O'Brien A, Robbins TW (1991) The basolateral amygdala-ventral striatal system and conditioned place preference: further evidence of limbic-striatal interactions underlying reward-related processes. *Neuroscience.* 42(1):1-18.
- Fallon JH, Riley JN, Sipe JC, Moore RY (1978) The islands of Calleja: organization and connections. *J Comp Neurol.* 181(2):375-95.
- Fang J, Clemens LG (1999) Contextual determinants of female-female mounting in laboratory rats. *Anim Behav* 57(3):545-555.
- Feder HH (1984) Hormones and sexual behavior. *Annu Rev Psychol.* 35:165-200.

- Ferstl, R., F. Eggert, E. Westphal, N. Zavazava & W. Müller-Ruchholtz (1992) MHC-related odors in humans. In *Chemical Signals in Vertebrates VI* (eds. R.L. Doty and D. Müller-Schwarze), pp. 205-211 New York: Plenum Press.
- Franklin KB, McCoy SN (1979) Pimozide-induced extinction in rats: stimulus control of responding rules out motor deficit. *Pharmacol Biochem Behav.* 11(1):71-5.
- Fouriez G, Wise RA (1976) Pimozide-induced extinction of intracranial self-stimulation: response patterns rule out motor performance deficits. *Brain Res.* 103(2):377-80.
- Franklin K, Paxinos G (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, San Diego: *Academic Press*.
- Fouriez G, Hansson P, Wise RA (1978) Neuroleptic-induced attenuation of brain stimulation reward in rats. *J Comp Physiol Psychol.* 92(4):661-71.
- Galef BG Jr, Kaner HC (1980) Establishment and maintenance of preference for natural and artificial olfactory stimuli in juvenile rats. *J Comp Physiol Psychol.* 94(4):558-95.
- Gallistel CR, Boytim M, Gomita Y, Klebanoff L (1982) Does pimozide block the reinforcing effect of brain stimulation? *Pharmacol Biochem Behav.* 17(4):769-81.

- Gallistel CR, Freyd G (1987) Quantitative determination of the effects of catecholaminergic agonists and antagonists on the rewarding efficacy of brain stimulation. *Pharmacol Biochem Behav.* 26(4):731-41.
- Gallistel CR, Karras D (1984) Pimozide and amphetamine have opposing effects on the reward summation function. *Pharmacol Biochem Behav.* 20(1):769-81.
- Gomez DM, Newman SW (1992) Differential projections of the anterior and posterior of the medial amygdaloid nucleus in the Syrian hamster. *J Comp Neurol.* 317(2):195-218.
- Good PI (1994) A practical guide to resampling methods for testing hypotheses. New York: Springer-Verlag.
- Good PI (2005) Permutation, Parametric and Bootstrap Tests of Hypotheses. (eds. Eds. P. Bickel, P. Diggle, S. Fienberg, U. Gather, I. Olkin, S. Zeger), Springer.
- Gregg B, Thiessen DD (1981) A simple method of olfactory discrimination of urines for the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Physiol Behav.* 26(6):1133-6.
- Gregory EH, Bishop A (1975) Development of olfactory-guided behaviour in the golden hamster *Physiol. Behav.* 15:373-376.

- Grus WE, Shi P, Zhang J (2007) Largest vertebrate vomeronasal type 1 receptor gene repertoire in the semiaquatic platypus. *Mol Biol Evol.* 24(10)2153-7.
- Gutierrez-Castellanos N, Martínez-García F, Lanuza E (2008) Proyecciones ricas en zinc desde la amígdala vomeronasal al estriado ventral del ratón. Acceso de la información feromonal al sistema del refuerzo. Comunicació oral a les segones Jornades Olfactives organitzades per la Red Olfactiva Española (ROE).
- Halpern M (1987) The organization and function of the vomeronasal system. *Annu Rev Neurosci.* 10:325-62. Review.
- Halpern M, Martinez-Marcos A (2003) Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Prog Neurobiol.* 70:245-318. (DOI:10.1016/S0301-0082(03)00103-5).
- Hayashi S (1985) A preputial odor imprinted in female mice. *J Ethol* 3:89-91.
- Hecker E, Butenandt A (1984) Bombycol revisited-reflections on a pioneering period and on some of its consequence. *In Techniques in Pheromones Research* (eds. Hummer H.E, Millar T.A), pp.1-44 New York: Springer-Verdag.

- Henzel WJ, Rodriguez H, Singer AG, Stults JT, Macrides F, Agosta WC, Niall H J (1988). The primary structure of aphrodisin. *Biol Chem.* 263(32):16682-7.
- Hepper PG (1987) The amniotic fluid: An important priming role in kin recognition. *Anim Behav.* 35:1343-1346.
- Holy TE, Guo Z (2005) Ultrasonic songs of male mice. *PLoS Biol.* 3(12):e386.
- Howard CV, Reed M.G (2004) Unbiased Stereology. Three Dimensional Measurement in Microscopy. pp.256. Taylor and Francis Ltd.
- Hudson R, Distel H (1986) Pheromonal release of suckling in rabbits does not depend on the vomeronasal organ. *Physiol Behav.* 37:123-8.
- Hughes AM, Everitt BJ, Herbert J (1990) Comparative effects of preoptic area infusions of opioid peptides, lesions and castration on sexual behaviour in male rats: studies of instrumental behaviour, conditioned place preference and partner preference. *Psychopharmacology.* 102(2):243-56.
- Humphries RE, Robertson DH, Beynon RJ, Hurst JL (1999) Unravelling the chemical basis of competitive scent marking in house mice. *Anim Behav.* 58(6):1177-1190.

- Hurst JL (1990a) Urine marking in populations of wild mice *Mus domesticus* Ruddy. I.: Communication between males (1990). *Anim Behav.* 40:209-222.
- Hurst JL (1990b) Urine marking in populations of wild mice *Mus domesticus* Ruddy. II. Communication between females (1990b). *Anim Behav.* 40:209-222.
- Hurst JL (1990c) Urine marking in populations of wild mice *Mus domesticus* Ruddy. III. Communication between the sexes (1990c). *Anim Behav.* 40:209-222.
- Hurst JL, Beynon RJ (2004) Scent wars: the chemobiology of competitive signalling in mice. *Bioessays* 26:1288-1298.
- Hurst JL, Payne CE, Nevison CM, Marie AD, Humphries RE, Robertson DH, Cavaggioni A, Beynon RJ (2001) Individual recognition in mice mediated by major urinary proteins. *Nature.* 414:631-634.
- Hurst JL, Robertson DHL, Tolladay U, Beynon RJ (1998) Proteins in urine scent marks of male house mice extend the longevity of olfactory signals. *Anim Behav.* 55(5):1289-97.
- Ikemoto S (2003) Involvement of the olfactory tubercle in cocaine reward: intracranial self-administration studies. *J Neurosci.* 23(28):9305-11.

- Ikemoto S, Qin M, Liu ZH (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? *J Neurosci.* 25(20):5061-5.
- Ishii T, Hirota J, Mombaerts P (2003) Combinatorial coexpression of neural and immune multigene families in mouse vomeronasal sensory neurons. *Curr Biol.* 13(5):394-400.
- Jacobson L (1811) Description anatomique d'un organe observe dans les mammifers. *Annales du Museum d'histoire Naturelle (Paris).* 18:412-424.
- Jansson A, Tinner B, Bancila M, Vergé D, Steinbusch HW, Agnati LF, Fuxe K (2001). Relationships of 5-hydroxytryptamine immunoreactive terminal-like varicosities to 5-hydroxytryptamine-2A receptor-immunoreactive neuronal processes in the rat forebrain. *J Chem Neuroanat.* 22(3):185-203.
- Janus C (1993) Stability of olfactory preferences for artificial odors briefly experienced by the presencual spiny mouse young. *Behav Neur. Biol.* 52:430-436.
- Jemiolo B, Alberts J, Sochinski-Wiggins S, Harvey S, Novotny M (1985) Behavioural and endocrine responses of female mice to

synthetic analogues of volatile compounds in male urine. *Anim Behav* 33:1114–1118.

Jemiolo B, Andreolini F, Xie TM, Wiesler D, Novotny M (1989) Puberty-affecting synthetic analogs of urinary chemosignals in the house mouse, *Mus domesticus*. *Physiol Behav.* 46(2):293-8.

Jemiolo B, Xie TM, Novotny M (1991) Socio-sexual olfactory preference in female mice: attractiveness of synthetic chemosignals. *Physiol Behav.* 50:1119-1122.

Jenkins WJ, Becker JB (2003) Female rats develop conditioned place preferences for sex at their preferred interval. *Horm Behav.* 43:503-507.

Johnston RE (1981) Attraction to odors in hamsters: an evaluation of methods. *J Comp Physiol Psychol* 95:951-960.

Jones RB, Nowell NW (1974) A comparison of aversive and female attractant properties of urine from dominant and subordinate male mice. *Animal Learn Behav.* 2:141-144.

Kane F, Coulombe D, Miliaressis E (1991) Amygdaloid self-stimulation: a movable electrode mapping study. *Behav Neurosci.* 105(6):926-32.

Karlson P, Luscher M (1959) Pheromones': a new term for a class of biologically active substances. *Nature* 183:55-56.

- Keller M, Pierman S, Douhard Q, Baum MJ, Bakker J (2006a) The vomeronasal organ is required for the expression of lordosis behaviour, but not sex discrimination in female mice. *Eur J Neurosci* 23:521-30.
- Keller M, Douhard Q, Baum MJ, Bakker J (2006b) Destruction of the main olfactory epithelium reduces female sexual behavior and olfactory investigation in female mice. *Chem Senses* 31:315-323.
- Keller M, Douhard Q, Baum MJ, Bakker J.(2006c) Sexual experience does not compensate for the disruptive effects of zinc sulfate--lesioning of the main olfactory epithelium on sexual behavior in male mice. *Chem Senses*. 31:753-62.
- Kelley AE, Berridge KC (2002) The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *J Neurosci*. 22(9):3306-11.
- Kelliher KR (2007) The combined role of the main olfactory and vomeronasal systems in social communication in mammals. *Horm Behav*. 52:561-70.
- Kelliher KR, Spehr M, Li XH, Zufall F, Leinders-Zufall T (2006) Pheromonal recognition memory induced by TRPC2-independent vomeronasal sensing. *Eur J Neurosci*. 23:3385-3390.

- Kerchner M, Vatza EJ, Nyby J (1986). Ultrasonic vocalizations by male house mice (*Mus musculus*) to novel odors: roles of infant and adult experience. *J Comp Psychol.* 100(3):253-61.
- Kimchi T, Xu J, Dulac C (2007) A functional circuit underlying male sexual behaviour in the female mouse brain. *Nature* 448:1009-1014.
- Kimelman BR, Lubow RE (1974) The inhibitory effect of preexposed olfactory cues on intermale aggression in mice. *Physiol Behav.* 12(6):919-22.
- Kimoto H, Haga S, Sato K, Touhara K (2005) Sex-specific peptides from exocrine glands stimulate mouse vomeronasal sensory neurons. *Nature* 437:898-901.
- King JA (1959) Relationships between early social experience and adult aggressive behavior in inbred mice. *J Genetic Psychol.* 90:151-166.
- King JA, Gurney NL (1954) Effect of early social experience on adult aggressive behaviour in inbred mice. *Physiol. Psychol.* 47:326-330.
- Kippin TE, Pfauss JG (2001) The nature of the conditioned response mediating olfactory conditioned ejaculatory preference in the male rat. *Behav Brain Res.* 122(a):11-24.

- Kobayakawa K, Kobayakawa R, Matsumoto H, Oka Y, Imai T, Ikawa M, Okabe M, Ikeda T, Itohara S, Kikusui T, Mori K, Sakano H (2007) Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb. *Nature*. 22:503-8.
- Kohlert JG, Olexa N (2004) The role of vaginal stimulation for the acquisition of conditioned place preference in female Syrian hamsters. *Physiol Behav*. 84(1):135-9.
- Koob GF (1992) Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol Sci*. 13(5):177-84.
- Koob GF, LeMoal M (2006) Neurobiology of Addiction. *Academic Press*.
- Kornetsky C, Huston-Lyons D, Porrino LJ (1991) The role of the olfactory tubercle in the effects of cocaine, morphine and brain-stimulation reward. *Brain Res*. 541(1):75-81.
- Kosel KC, Van Hoesen GW, West JR (1981) Olfactory bulb projections to the parahippocampal area of the rat. *The journal of Comparative Neurology*. 198:467-482.
- Krieger NR, Megill JR, Sterling P.J (1983) Granule cells in the rat olfactory tubercle accumulate 3H-gamma-aminobutyric acid. *Comp Neurol*. 215(4):465-71.

- Kruhoffer M, Bub A, Cieslak A, Adermann K, Kunstyr I, Forssmann W, Mägert H (1997) Gene expression of aphrodisin in female hamster genital tract segments. *Cell Tissue Res.* 287(1):153-60.
- Kubie JL (1980) Garter snake trailing behavior: effects of varying prey-extract concentration and mode of prey-extract presentation. *J Comp Physiol Psychol.* 92(2):362-73.
- Kubie J, Halpern M (1979) Chemical senses involved in garter snake prey trailing. *Journal of Comparative Physiology and Psychology.* 93: 648-667.
- Le Magnen L (1951) Etude des phénomènes olfacto-sexuels chez le rat blanc. *Arcad. Sci. Paris.* 145:1636-1641.
- Lee S, van der Boot LM (1955) Spontaneous pseudopregnancy in mice. *Acta Physiol Pharmacol Neerl.* 4, 442-443.
- Lee S, van der Boot LM (1956) Spontaneous pseudopregnancy in mice II. *Acta Physiol Pharmacol Neerl.* 5, 213-214.
- Lechonova P, Havlicek J (2008) Human Body Odour Individuality In: *Chemical Signals in Vertebrates 11* (Hurst JL, Beynon RJ, Roberts SC, Wyatt TD, eds), pp 261-270 Chester: Springer-Verlag.
- LeGross Clark WE, Meyer M (1947) The terminal connections of the olfactory tract in the rabbit. *Brain.* 70:340-328.

- Leinders-Zufall T, Brennan P, Widmayer P, PC S, Maul-Pavicic A, Jager M, Li XH, Breer H, Zufall F, and Boehm T (2004) MHC class I peptides as chemosensory signals in the vomeronasal organ. *Science* 306:1033-1037.
- Leinders-Zufall T, Cockerham RE, Michalakis S, Biel M, Garbers DL, Reed RR, Zufall F, Munger SD (2007) Contribution of the receptor guanylyl cyclase GC-D to chemosensory function in the olfactory epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(36):14507-12.
- Leinders-Zufall T, Lane AP, Puche AC, Ma W, Novotny MV, Shipley MT, Zufall F (2000) Ultrasensitive pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons. *Nature* 405:792-796.
- Lepore M, Vorel SR, Lowinson J, Gardner EL (1995) Conditioned place preference induced by delta 9-tetrahydrocannabinol: comparison with cocaine, morphine, and food reward. *Life Sci*. 56(23-24):2073-80.
- Lévai O, Feistel T, Breer H, Strotmann J (2006) Cells in the vomeronasal organ express odorant receptors but project to the accessory olfactory bulb. *J Comp Neurol*. 498(4):476-90.
- Leybold BG, Yu CR, Leinders-Zufall T, Kim MM, Zufall F, Axel R (2002) Altered sexual and social behaviors in *trp2* mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6376-6381.

- Liberles SD, Buck LB (2006) A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium. *Nature*. 442(7103):645-50.
- Liman ER, Innan H (2003) Relaxed selective pressure on an essential component of pheromone transduction in primate evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(6):3328-32.
- Lin da Y, Shea SD, Katz LC (2006) Representation of natural stimuli in the rodent main olfactory bulb. *Neuron* 50:937-949.
- Lin DY, Zhang SZ, Block E, Katz LC (2005) Encoding social signals in the mouse main olfactory bulb. *Nature* 434:470-477.
- Lin W, Margolskee R, Donnert G, Hell SW, Restrepo D (2007) Olfactory neurons expressing transient receptor potential channel M5 (TRPM5) are involved in sensing semiochemicals. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:2471-2476.
- Loconto J, Papes F, Chang E, Stowers L, Jones EP, Takada T, Kumánovics A, Fischer Lindahl K, Dulac C (2003) Functional expression of murine V2R pheromone receptors involves selective association with the M10 and M1 families of MHC class Ib molecules. *Cell*. 7;112(5):607-18.
- Luo AH, Cannon EH, Wekesa KS, Lyman RF, Vandenberg JG, Anholt RR (2002) Impaired olfactory behavior in mice deficient in the alpha subunit of G(o). *Brain Res* 941:62-71.

- Luo M, Fee MS, and Katz LC (2003) Encoding pheromonal signals in the accessory olfactory bulb of behaving mice. *Science* 299:1196-1201.
- Lydell K, Doty RL (1972) Male rat odors preferences for female urine as a function of sexual experience, urine age, and urine source. *Hormon Behav.* 3:205-212.
- MacDonald AF, Billington CJ, Levine AS (2004) Alterations in food intake by opioid and dopamine signaling pathways between the ventral tegmental area and the shell of the nucleus accumbens. *Brain Res.* 1018(1):78-85.
- Mägert HJ, Hadrys T, Cieslak A, Gröger A, Feller S, Forssmann WG (1995) cDNA sequence and expression pattern of the putative pheromone carrier aphrodisin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14;92(6):2091-5.
- Malnic B, Hirono J, Sato T, Buck LB (1999) Combinatorial receptor codes for odors. *Cell.* 96(5):713-23.
- Mandiyani VS, Coats JK, Shah NM (2005) Deficits in sexual and aggressive behaviors in *Cnga2* mutant mice. *Nat Neurosci* 8:1660-1662.
- Manly B (1997) Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in biology. London: Chapman & Hall.
- Manning CJ, Wakeland EK, Potts WK (1992) Communal nesting patterns in mice implicate MHC genes in kin recognition. *Nature.* 360(6404):581-3.

- Martel KL, Baum MJ (2007) Sexually dimorphic activation of the accessory, but not the main, olfactory bulb in mice by urinary volatiles. *Eur J Neurosci* 26:463-475.
- Martinez I, Paredes RG (2001) Only self-paced mating is rewarding in rats of both sexes. *Horm Behav* 40:510-517.
- Martínez-García F, Agustín-Pavón C, Martínez-Hernández J, Martínez-Ricós J, Moncho-Bogani J, Novejarque A, Lanuza E (2007) Have Sexual Pheromones Their Own Reward System in the Brain of Female Mice?. In: *Chemical Signals in Vertebrates* 11 (Hurst JL, Beynon RJ, Roberts SC, Wyatt TD, eds), pp 261-270 Chester: Springer-Verlag.
- Martinez-Garcia F, Martinez-Ricos J, Agustin-Pavon C, Martinez-Hernandez J, Novejarque A, Lanuza E (2008) Redefining the dual olfactory hypothesis: Pheromones reward and odour experience. *Brain Res.* (Epub ahead of print).
- Martinez-Garcia F, Olucha FE, Teruel V, Lorente MJ, Schwerdtfeger WK (1991) Afferent and efferent connections of the olfactory bulbs in the lizard *Podarcis hispanica*. *J Comp Neurol.* 305(2):337-47.
- Martinez-Hernandez (2008/2009) La vía tegmento-estriatal y el refuerzo mediante feromonas sexuales. Un estudio anatómico

y comportamental en ratón. *Tesis Doctoral. Universitat de València*

Martinez-Hernandez J, Lanuza E, Martinez-Garcia F (2006) Selective dopaminergic lesions of the ventral tegmental area impair preferences for sucrose but not for male sexual pheromones in female mice. *Eur J Neurosci.* 24(3):885-93.

Martinez-Marcos A, Halpern M (2006) Efferent connections of the main olfactory bulb in the opossum (*Monodelphis domestica*): a characterization of the olfactory entorhinal cortex in a marsupial. *Neuroscience Letters.* 396:51-56.

Martinez-Ricos J, Agustin-Pavon C, Lanuza E, Martinez-Garcia F (2007) Intraspecific communication through chemical signals in female mice: reinforcing properties of involatile male sexual pheromones. *Chem Senses* 32:139-148.

Martinez-Ricos J, Agustin-Pavon C, Lanuza E, Martinez-Garcia F (2008) Role of the vomeronasal system in intersexual attraction in female mice. *Neuroscience.* 153(2):383-95.

McClintock, M (1971) Menstrual synchrony and suppression. *Nature* 291, 244–245 .

McClintock MK (2002) Pheromones, Odors, and Vasanas: The Neuroendocrinology of Social Chemosignals in Humans and Animals. In *Hormones Brain and Behaviour I.* (eds. Pfaff DW,

Arnold AP, Fahrbach SE, Etgen AM, Rubin RT), pp. 797-870. New York: Academy Press.

McDonald AJ (1991) Organization of amygdaloid projections to the prefrontal cortex and associated striatum in the rat. *Neuroscience*. 44(1):1-14.

Mehrara BJ, Baum MJ (1990) Naloxone disrupts the expression but not the acquisition by male rats of a conditioned place preference response for an oestrous female. *Psychopharmacology*. 101(1):118-25.

Meisami E, Bhatnagar KP (1998) Structure and diversity in mammalian accessory olfactory bulb. *Microsc Res Tech*. 43(6):476-99. Review.

Meisel RL, Joppa MA (1994) Conditioned place preference in female hamsters following aggressive or sexual encounters. *Physiol Behav*. 56(5):1115-8.

Meisel RL, Joppa MA, Rowe RK (1996) Dopamine receptor antagonists attenuate conditioned place preference following sexual behaviour in female Syrian hamsters. *Eur J Pharmacol*. 309(1):21-4.

Meisel RL, Mullins AJ (2006) Sexual experience in female rodents: cellular mechanisms and functional consequences. *Brain Res*. 1126(1):56-65. Review

- Meredith M (1986) Vomeronasal organ removal before sexual experience impairs male hamster mating behavior. *Physiol Behav* 36:737-743.
- Meredith M, Marques DM, O'Connell RO, Stern FL (1980) Vomeronasal pump: significance for male hamster sexual behavior. *Science* 207:1224-1226.
- Merigo F, Mucignat-Caretta C, Zancanaro C (2005) Timing of neuronal intermediate filament proteins expression in the mouse vomeronasal organ during pre- and postnatal development. An immunohistochemical study. *Chem Senses*. 30:707-17.
- 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. *J Comp Neurol*. 15;284(3):405-28.
- Meyer RP (1981) Central connections of the olfactory bulb in the American opossum (*Didelphys virginiana*): a light microscopic degeneration study. *The anatomical Record*. 201:141-156.
- Michael RP, Keverne EB (1968) Pheromones in the communication of sexual status in primates. *Nature*. 218(5143):746-9

- Michael RP, Keverne EB (1970) A male sex-attractant pheromone in rhesus monkey vaginal secretions. *J Endocrinol.* 46(2):xx-xxi.
- Mijnster MJ, Raimundo AG, Koskuba K, Klop H, Docter GJ, Groenewegen HJ, 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. *J Comp Neurol.* 389(1):1-11.
- Miller RL, Baum MJ (1987) Naloxone inhibits mating and conditioned place preference for an oestrous females in male rats soon after castration. *Pharmacol Biochem Behav.* 26(4):781-9
- Mohedano-Moriano A, Pro-Sistiaga P, Ubeda-Bañón I, Crespo C, Insausti R, Martinez-Marcos A (2007) Segregated pathways to the vomeronasal amygdala: differential projections from the anterior and posterior divisions of the accessory olfactory bulb. *Eur J Neurosci.* 25(7):2065-80.
- Mombaerts P.N (2004) Love at first smell. *Engl J Med.* 351(25):2579-80.
- Mombaerts PN (2001) The human repertoire of odorant receptor genes and pseudogenes. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2:493-510. Review.

- Moncho-Bogani J, Lanuza E, Hernandez A, Novejarque A, and Martinez-Garcia F (2002) Attractive properties of sexual pheromones in mice. Innate or learned? *Physiol Behav* 77:167-176.
- Moncho-Bogani J, Lanuza E, Lorente MJ, Martinez-Garcia F (2004) Attraction to male pheromones and sexual behaviour show different regulatory mechanisms in female mice. *Physiol Behav.* 81:427-434.
- Moncho-Bogani J, Martinez-Garcia F, Novejarque A, and Lanuza E (2005) Attraction to sexual pheromones and associated odorants in female mice involves activation of the reward system and basolateral amygdala. *Eur J Neurosci* 21:2186-2198.
- Morè L (2006) Mouse major urinary proteins trigger ovulation via the vomeronasal organ. *Chem Senses* 31:393-401.
- Mossman CA, Drickamer LC (1996) Odor preferences of female house mice (*Mus domesticus*) in seminatural enclosures. *J Comp Psychol* 110:131-138.
- Mucignat-Caretta C, Caretta A, Baldini E (1998) Protein-bound male urinary pheromones: differential responses according to age and gender. *Chem Senses* 23:67-70.

- Mucignat-Caretta C, Caretta A, Cavaggioni A.J (1995) Acceleration of puberty onset in female mice by male urinary proteins. *Physiol.* 486 (Pt 2):517-22.
- Ninomiya K, Kimura T (1988) Male odors that influence the preference of female mice: roles of urinary and preputial factors. *Physiol Behav.* 44(6):791-5.
- Novejarque A. (2007) Evolución del cerebro emocional: Análisis comparado de las vías amígdalo-estriatales. *Tesis Doctoral. Universitat de València.*
- Novotny MV, Harvey S, Jemiolo B, Alberts J (1990) Chemistry of male dominance in the house mouse, *Mus domesticus*. *Experientia*, 46, 109-113.
- Novotny MV, Harvey S, Jemiolo B, Alberts J (1985) Synthetic pheromones that promote inter-male aggression in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:2059-2061.
- Novotny MV, Ma W, Wiesler D, Zidek L (1999) Positive identification of the puberty-accelerating pheromone of the house mouse: the volatile ligands associating with the major urinary protein. *Proc Biol Sci.* 266(1432):2017-22.
- Norlin EM, Gussing F, Berghard A (2003) Vomeronasal phenotype and behavioral alterations in G alpha i2 mutant mice. *Curr Biol* 13:1214-1219.

- Nyby J, Bigelow J, Kerchner M, Barbehenn F (1983) Male mouse (*Mus musculus*) ultrasonic vocalizations to female urine: why is heterosexual experience necessary? *Behav Neural Biol.* 38(1):32-46.
- Nyby J, Kay E, Bean NJ, Dahinden Z, Kerchner M (1985) Male mouse attraction to airbor urinary odors of conespecifics and to food odors. Effects of food deprovation. *Comp Physiol Psychol.* 99: 479-490.
- Olds ME, Fobes JL (1981) The central basis of motivation: intracranial self-stimulation. *Annu Rev Psychol.* 32:523-74
- 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.
- Papp M (1988) Similar effects of diazepam and the 5-HT₃ receptor antagonist ICS 205-930 on place aversion conditioning. *Eur J Pharmacol* 151(2):321-4.
- Papp M, Willner P, Muscat R (1991) An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. *Psychopharmacology* 104(2):225-9.

- Pankevich DE, Baum MJ, and Cherry JA (2004) Olfactory sex discrimination persists, whereas the preference for urinary odorants from estrous females disappears in male mice after vomeronasal organ removal. *J Neurosci* 24:9451-9457.
- Paredes RG, Agmo A (2004) Has dopamine a physiological role in the control of sexual behaviour? A critical review of the evidence. *Prog Neurobiol.* 73(3):179-226
- Paredes RG, Vazquez B (1999) What do female rats like about sex? Paced mating. *Behav Brain Res.* 105(1):117-27.
- Peciña S, Berridge KC (2005) Hedonic hot spot in nucleus accumbens shell: where do mu-opioids cause increased hedonic impact of sweetness? *J Neurosci* 25(50):11777-86.
- Peele P, Salazar I, Mimmack M, Keverne EB, Brennan PA (2003) Low molecular weight constituents of male mouse urine mediate the pregnancy block effect and convey information about the identity of the mating male. *Eur J Neurosci.* 18(3):622-8.
- Perks SM, Clifton PG (1997) Reinforcer revaluation and conditioned place preference. *Physiol. Behav.* 61(1):183-94.
- Petruelis A, Johnston RE (1997) Causes of scent marking in female golden hamsters (*Mesocricetus auratus*): specific signals or classes of information?. *J Comp Psychol* 111:25-36.

- Petrulis A, Peng M, and Johnston RE (1999) Effects of vomeronasal organ removal on individual odor discrimination, sex-odor preference, and scent marking by female hamsters. *Physiol Behav* 66:73-83.
- Phillips AG, Mogenson GJ (1968) Effects of taste on self-stimulation and induced drinking *J Comp Physiol Psychol.* 66(3):654-60..
- Pitkänen A, Pikkarainen M, Nurminen N, Ylinen A (2000) Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Ann N Y Acad Sci.* 911:369-91.
- Pontieri FE, Tanda G, Di Chiara G (1995) Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the “shell” as compared with the “core” of the rat nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci.* 92(26):12304-8.
- Poole TB, Morgan HDR (1976) Social and territorial behaviour of laboratory mice (*Mus musculus*). *Anim. Behav* 24, pp. 476–480.
- Porrino LJ, Lyons D, Miller MD, Smith HR, Friedman DP, Daunais JB, Nader MA (2002) Metabolic mapping of the effects of cocaine during the initial phases of self-administration in the

- nonhuman primate. *J Neurosci.* 22(17):7687-94
- Porter RH, Winberg J (1999) Unique salience of maternal breast odors for newborn infants. *Neurosci Biobehav Rev.* 23(3):439-49.
- Portillo W, Paredes RG (2004) Sexual incentive motivation, olfactory preference, and activation of the vomeronasal projection pathway by sexually relevant cues in non-copulating and naive male rats. *Horm Behav.* 46(3):330-40.
- Potts WK, Manning CJ, Wakeland EK (1991) Mating patterns in seminatural populations of mice influenced by MHC genotype. *Nature.* 352(6336):619-21.
- Prado-Alcalá R, Wise RA (1984) Brain stimulation reward and dopamine terminal fields. I. Caudate-putamen, nucleus accumbens and amygdala. *Brain Res.* 297(2):265-73.
- Price JL (1973) An autoradiographic study of complementary laminar patterns of termination of afferents fibers to the olfactory complex. *The journal of Comparative Neurology.* 150:87-108.
- Price JL, Slotnick BM, Revial MF (1991) Olfactory projections to the hypothalamus. *J Comp Neurol.* 306(3):447-61.
- Pro-Sistiaga P, Mohedano-Moriano A, Ubeda-Bañon I, Del Mar Arroyo-Jimenez M, Marcos P, Artacho-Pérula E, Crespo C, Insausti R, Martinez-Marcos A (2007). Convergence of

olfactory and vomeronasal projections in the rat basal telencephalon. *J Comp Neurol.* 504(4):346-62.

Raisman G (1972) An experimental study of the projection of the amygdala to the accessory olfactory bulb and its relationship to the concept of dual olfactory system. *Experimental Brain Research.* 14:395-408.

Ramm SA, Cheetham SA, Hurst JL (2008) Encoding choosiness: female attraction requires prior physical contact with individual male scents in mice. *Proc Biol Sci.* 275(1644):1727-35.

Reasner DS, Johnston RE (1987) Scent marking by male dwarf hamsters (*Phodopus sungorus campbelli*) in response to conspecific odors. *Behav Neural Biol.* 48(1):43-8.

Restrepo D, Arellano J, Oliva AM, Schaefer ML, 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. *Horm Behav* 46:247-256.

Reynolds AM, Reynolds DR, Smith AD, Svensson GP, Lofstedt C (2007) Appetitive flight patterns of male *Agrotis segetum* moths over landscape scales. *J Theor Biol.* 245: 141-149.

- Rich TJ, Hurst JL (1999) The competing countermarks hypothesis: reliable assessment of competitive ability by potential mates. *Anim Behav* 58:1027-1037.
- Rice WR (2002) Experimental tests of the adaptative significance of sexual recombination. *Nat Rev Genet.* 3:241-251.
- Robertson DHL, Beynon RJ, Evershed RP (1993) Extraction, characterization and binding analysis of two pheromonally active ligands associated with major urinary proteins of house mouse (*Mus musculus*). *J Chem Ecol.* 19:1405-1416.
- Robertson DHL, Marie AD, Veggerby C, Hurst JL, Beynon RJ (2001) Characteristics of ligand and release by major urinary proteins. In *Chemical Signals in Vertebrates* (eds. Marchlewska-Koj A, Muller-Schwarze D, Lepri J), pp. 169-176. New York: Plenum Press
- Robinson S, Sandstrom SM, Denenberg VH, Palmiter RD (2005) Distinguishing whether dopamine regulates liking, wanting, and/or learning about rewards. *Behav Neurosci.* 119(1):5-15.
- Robinson TE, Berridge KC (2003) Addiction. *Annu Rev Psychol.* 54, 25-53.
- Rodriguez I, Mombaerts P (2000) Novel human vomeronasal receptor-like genes reveal species-specific families. *Curr Biol.* 12(12):R409-11.

- Romero PR, Beltramino CA, Carrer HF (1990) Participation of the olfactory system in the control of approach behavior of the female rat to the male. *Physiol Behav.* 47(4):685-90.
- Routtenberg A, Sloan M (1972) Self-stimulation in the frontal cortex of *Rattus norvegicus*. *Behav Biol.* 7(4):567-72.
- Russell MJ (1976) Human olfactory communication. *Nature.* 260(5551):520-2.
- Sam M, Vora S, Malnic B, Ma W, Novotny MV, Buck LB (2001) Neuropharmacology. Odorants may arouse instinctive behaviours. *Nature* 412:142.
- Scalia F (1966) Some olfactory pathways in the rabbit brain. *The journal of comparative neurology.* 126:285-310.
- Scalia F, Gallousis G, Roca S (1991) Differential projections of the main and accessory olfactory bulb in the frog. *J Comp Neurol.* 305(3):443-61.
- Scalia F, Winans SS (1970) Amygdaloid nucleus: new afferent input from the vomeronasal organ. *Science.* 170(955):330-2.
- Scalia F, Winans SS (1975) The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J Comp Neurol.* 161(1):31-55.

- Schank J (2001) Do Norway rats (*Rattus norvegicus*) synchronize their estrous cycles? *Physiol Behav.* 72(1-2):129-39.
- Schank J (2001) Measurement and cycle variability: reexamining the case for ovarian-cycle synchrony in primates. *Behav Processes.* 3;56(3):131-146).
- Schank J (2004) Avoiding synchrony as a strategy of female mate choice. *Nonlinear Dynamics Psychol Life Sci.* 8(2):147-76.
- Schank J, McClintock M. K (1992) A coupled-oscillator model of ovarian-cycle synchrony among female rats. *J. Theor. Biol.* 157, 317-362.
- Schaal B, Coureaud G, Langlois D, Giniès C, Sémon E (2003) Chemical and behavioural characterization of the rabbit mammary pheromone. *Nature.* 424(6944):68-72.
- Schaal B, Doucet S, Sagot P, Hertling E, Soussignan R (2006) Human breast areolae as scent organs: morphological data and possible involvement in maternal-neonatal coadaptation. *Dev Psychobiol.* 48:100-10.
- Schaal B, Marlier, Soussignan R (1998) Olfactory function in the human fetus: evidence from selective neonatal responsiveness to the odor of amniotic fluid. *Behav Neurosci.* 112(6):1438-49.
- Schank JC (2001) Do Norway rats (*Rattus norvegicus*) synchronize their estrous cycles? *Physiol Behav.* 72:129-39.

- Schneider D (2000) Insect pheromone research: some history and 45 years of personal recollections. In *IOBC wprs Bulletin*: 22(9) (eds. Witzgall P & El-Sayed A).
- Scott JW, Pfaff DW (1970) Behavioral and electrophysiological responses of female mice to male urine odors. *Physiol Behav.* 5(4):407-11.
- Sellings LH, McQuade LE, Clarke PB (2006) Evidence for multiple sites within rat ventral striatum mediating cocaine-conditioned place preference and locomotor activation. *J Pharmacol Exp Ther.* 317(3):1178-87.
- Shimura T, Kamada Y, Yamamoto T (2002) Ventral tegmental lesions reduce overconsumption of normally preferred taste fluid in rats. *Behav Brain Res.* 134(1-2):123-30.
- Shipley MT, Adamek GD (1984) The connections of the mouse olfactory bulb: a study using orthograde and retrograde transport of wheat germ agglutinin conjugated to horseradish peroxidase. *Brain Res Bull.* 12(6):669-88.
- Schultz W (2007) Behavioural dopamine signals. *Trends Neurosci.* 30(5):203-10.
- Schultz W (2002) Getting formal with dopamine and reward. *Neuron.* 36(2):241-63.

- Schwende FJ, Wiesler D, Jorgenson JW, Carmack M, and Novotny MV (1986) Urinary volatile constituents of the house mouse, *Mus musculus*, and their endocrine dependency. *J. Chem. Ecol.* 12, 277–296.
- Shammah-Lagnado SJ, Negrao N (1981) Efferent connections of the olfactory bulb in the opossum (*Didelphis marsuopiales arita*): a Fink-Heimer study. *The Journal of Comparative Neurology* 201:51-63
- Sharrow SD, Vaughn JL, Zidek L, Novotny MV, Stone MJ (2002) Pheromone binding by polymorphic mouse major urinary proteins. *Protein Sci* 11:2247-2256.
- Shipley MT, Ennis M, Puche AC (2004) Olfactory system. In *The rat Nervous System* (ed. Paxinos G), pp. 923-964 San Diego: Elsevier.
- Singer AG, Agosta WC, Clancy AN, Macrides F (1987) The chemistry of vomeronasally detected pheromones: characterization of an aphrodisiac protein. *Ann N Y Acad Sci.* 519:287-98.
- Singer AG, Clancy AN, Macrides F, Agosta WC (1984) Chemical studies of hamster vaginal discharge: effects of endocrine ablation and protein digestion on behaviorally active macromolecular fractions. *Physiol Behav.* 33:639-43.

- Singer AG, Macrides F (1990) Aphrodisin: pheromone or transducer? *Chem Senses*. 15:199-203.
- Singer AG, Macrides F, Clancy AN, Agosta WC (1986) Purification and analysis of a proteinaceous aphrodisiac pheromone from hamster vaginal discharge. *J Biol Chem*. 261(28):13323-6.
- Singh PB (2001) Chemosensation and genetic individuality. *Reproduction*. 121(4):529-39.
- Skeem LC, Hall WC (1977) Efferent projections of the main and accessory olfactory bulb in the tree shrew (*Tupaia glis*). *The journal of Comparative Neurology*. 172:1-35.
- Smith KS, Berridge KC (2005) The ventral pallidum and hedonic reward: neurochemical maps of sucrose "liking" and food intake. *J Neurosci*. 25(41):9554.
- Smith TD, Siegel MI, Burrows AM, Mooney MP, Burdi AR, Fabrizio PA, Clemente FR (1998) Searching for the vomeronasal organ of adult humans: preliminary findings on location, structure, and size. *Microsc Res Tech*. 41(6):483-91.
- Soares VC, Gubits RM, Feigelson P, and Costantini F (1987) Tissue-specific and hormonally regulated expression of a rat alpha 2u globulin gene in transgenic mice. *Mol Cell Biol* 7:3749-3758.

- Spanagel R, Weiss F (1999) The dopamine hypothesis of reward: past and current status. *Trends Neurosci.* 22(11):521-7.
- Spehr M, Kelliher KR, Li XH, Boehm T, Leinders-Zufall T, Zufall F (2006) Essential role of the main olfactory system in social recognition of major histocompatibility complex peptide ligands. *J Neurosci* 26:1961-1970.
- Stein EA, Fuller SA (1992) Selective effects of cocaine on regional cerebral blood flow in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 262(1):327-34.
- Steiner JE, Glaser D, Hawilo ME, Berridge KC (2001) Comparative expression of hedonic impact: affective reactions to taste by human infants and other primates. *Neurosci Biobehav Rev.* 25:53-74.
- Stern K, McClintock MK (1998) Regulation of ovulation by human pheromones. *Nature.* 392(6672):177-9.
- Stopka P, Janotova K, Heyrovsky D (2007) The advertisement role of major urinary proteins in mice. *Physiol Behav* 91:667-670.
- Stowers L, Holy TE, Meister M, Dulac C, Koentges G (2002) Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science* 295:1493-500.
- Strassmann BI (1999) Menstrual synchrony pheromones: cause for doubt. *Human Reproduction.* 14(3):579-580.

- Sundberg H, Døving K, Novikov S, Ursin H (1982) A method for studying responses and habituation to odors in rats. *Behav Neural Biol.* (1):113-9.
- Swanson LW (1982) The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res Bull.* 9(1-6):321-53.
- Teicher MH, Blass ME (1977) First suckling response of the newborn albino rat: the roles of olfaction and amniotic fluid. *Science.* 198(4317):635-6.
- Telle HJ (1966) Beitrag zur Kenntnis der Verhaltensweise von Ratten, verglichen dargestellt bei *Rattus norvegicus* und *Rattus rattus*. *Z Ang Zool.* 53:129-196.
- Tindell AJ, Berridge KC, Aldridge JW (2004) Ventral pallidal representation of pavlovian cues and reward: population and rate codes. *J Neurosci.* 24(5):1058-69.
- Tindell AJ, Smith KS, Peciña S, Berridge KC, Aldridge JW (2006) Ventral pallidum firing codes hedonic reward: when a bad taste turns good. *J Neurophysiol.* 96(5):2399-409.
- Tindell AJ, Berridge KC, Zhang J, Peciña S, Aldridge JW (2005) Ventral pallidal neurons code incentive motivation:

amplification by mesolimbic sensitization and amphetamine.
Eur J Neurosci. 22(10):2617-34.

Trotier D, Eloit C, Wassef M, Talmain G, Bensimon JL, Døving KB,
Ferrand J (2000) The vomeronasal cavity in adult humans.
Chem Senses. 25(4):369-80.

Turner BH, Gupta KC, Mishkin M (1978) The locus and
cytoarchitecture of the projection areas of the olfactory bulb in
Macaca mulatta. *The Journal of Comparative Neurology.*
177:381-396.

Turner BH, Mishkin M (1978) A reassessment of the direct projections
of the olfactory bulb. *Brain Research.* 151:375-380.

Tzschentke TM (1998) Measuring reward with the conditioned place
preference paradigm: a comprehensive review of drug effects,
recent progress and new issues. *Prog Neurobiol* 56:613-672.

Ubeda-Bañon I, Novejarque A, Mohedano-Moriano A, Pro-Sistiaga P,
de la Rosa-Prieto C, Insausti R, Martinez-Garcia F, Lanuza E,
Martinez-Marcos A (2007) Projections from the posterolateral
olfactory amygdala to the ventral striatum: neural basis for
reinforcing properties of chemical stimuli. *BMC Neurosci.*
29;8:103.

Ubeda-Bañon I, Novejarque A, Mohedano-Moriano A, Pro-Sistiaga P,
Insausti R, Martinez-Garcia F, Lanuza E, Martinez-Marcos A

- (2008) Vomeronasal inputs to the rodent ventral striatum. *Brain Res Bull.* 75(2-4):467-73.
- Ungerstedt U (1971) Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol Scand Suppl.* 367:95-122.
- Vanderbergh JG (1969) Male odors accelerates female sexual maturation in mice. *Endocrinology.* 81:658-660.
- Varendi H, Porter RH (2001) Breast odour as the only maternal stimulus elicits crawling towards the odour source. *Acta Paediatr.* 90(4):372-5.
- Vosshall LB (2008) Scent of a fly. *Neuron.* 59(5):685-9. Review.
- Vosshall LB (2005) Social signals: the secret language of mice. *Curr Biol* 15:R255-257.
- Wallace P (1977) Individual discrimination of humans by odor. *Physiol Behav.* 19(4):577-9.
- Wang D, Chen P, Quan W, Halpern M (2007) Suprasternal gland secretion of male short-tailed opossum induces IP3 generation in the vomeronasal organ. *Biochim Biophys Acta.* 1770(5):725-32.
- Wan H, Warburton EC, Kuśmierk P, Aggleton JP, Kowalska DM, Brown MW (2001) Fos imaging reveals differential neuronal

activation of areas of rat temporal cortex by novel and familiar sounds. *Eur J Neurosci.* 14(1):118-24.

Wang Z, Balet Sindreu C, Li V, Nudelman A, Chan GC, Storm DR (2006) Pheromone detection in male mice depends on signaling through the type 3 adenylyl cyclase in the main olfactory epithelium. *J Neurosci* 26:7375-7379.

Wedekind C, Seebeck T, Bettens F, Paepke AJ (1995) MHC-dependent mate preferences in humans. *Proc Biol Sci.* 260(1359):245-9.

Wersinger SR, Kelliher KR, Zufall F, Lolait SJ, O'Carroll AM, Young WS 3rd (2004) Social motivation is reduced in vasopressin 1b receptor null mice despite normal performance in an olfactory discrimination task. *Horm Behav.* 46:638-45.

Whitten WK (1956) Modification of the oestrous cycle of the mouse by external stimuli associated with the male. *J. Endocrinol.* 13:399-404.

Wicks L. F. (1941) Sex and proteinuria of mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 48: 395-400.

Wilson HC, Kiefhaber SH, Gravel V (1991) Two studies of menstrual synchrony: negative results. *Psychoneuroendocrinology.* 16(4):353-9.

- Wilson KC, Raisman G. (1980) Age-related changes in the neurosensory epithelium of the mouse vomeronasal organ: extended period of postnatal growth in size and evidence for rapid cell turnover in the adult. *Brain Res.*3:103-13.
- Winans SS, Powers JB (1977) Olfactory and vomeronasal deafferentation of male hamsters: histological and behavioral analyses. *Brain Res.* 126:325-344.
- Winans SS, Scalia F (1970) Amygdaloid nucleus: new afferent input from the vomeronasal organ. *Science.* 170:330-332.
- Wise RA (1996) Addictive drugs and brain stimulation reward. *Annu Rev Neurosci.* 19:319-40.
- Wise RA (2002) Brain reward circuitry: insights unsensed incentives. *Neuron.* 36(2):2209-40.
- Wise RA (1994) Cocaine reward and cocaine craving: the role of dopamine in perspective. *NIDA Res Monogr.* 145:191-206.
- Wise RA. (2004) Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci.* 5(6):483-94.
- Wise RA (2005) Forebrain substrates of reward and motivation. *J Comp Neurol.* 493(1):115-21.
- Wise RA, Hoffman DC (1992) Localization of drug reward mechanisms by intracranial injections. *Synapse.* 10(3):247-63.

- Wise RA, Rompre PP (1989) Brain dopamine and reward. *Annu Rev Psychol.* 40:191-225.
- Wise RA, Schwart HV (1981) Pimozide attenuates acquisition of lever-pressing for food. *Pharmacol Biochem Behav.* 15(4):665-6.
- Wise RA, Spindler J, de Wit H, Gerberg GJ (1978) Neuroleptic-induced "anhedonia" in rats: pimozide blocks reward quality of food. *Science.* 201(4352):262-4.
- Wong ST, Trinh K, Hacker B, Chan GC, Lowe G, Gaggar A, Xia Z, Gold GH, Storm DR (2000) Disruption of the type III adenylyl cyclase gene leads to peripheral and behavioral anosmia in transgenic mice. *Neuron* 27:487-497.
- Wyart C, Webster WW, Chen JH, Wilson SR, McClary A, Khan RM, Sobel N (2007) Smelling a single component of male sweat alters levels of cortisol in women. *J Neurosci.* 27(6):1261-5.
- Wyatt TD (2003) Pheromones and Animal Behaviour. Communication by Smell and Taste, First ed. Cambridge: Cambridge University Press, pp 391.
- Wysocki CJ, Katz Y, Bernhard R (1983) Male vomeronasal organ mediates female-induced testosterone surges in mice. *Biol Reprod* 28:917-922.

- Wysocki CJ, Nyby J, Whitney G, Beauchamp GK, and Katz Y (1982)
The vomeronasal organ: primary role in mouse chemosensory
gender recognition. *Physiol Behav* 29:315-327.
- Wysocki CJ, Bean NJ, and Beauchamp GK. (1986) The mammalian
vomeronasal system: Its role in learning and social behaviors.
In *Chemical Signals in Vertebrates IV* (eds. Duvall D, Muller-
Schwarze D and Silverstein RM), pp. 471. New York: Plenum
Press.
- Wysocki CJ, Nyby J, Whitney G, Beauchamp GK, Katz Y (1982) The
vomeronasal organ: primary role in mouse chemosensory
gender recognition. *Physiol Behav* 29:315-327.
- Wysocki CJ, Wellington JL, and Beauchamp GK (1980) Access of
urinary nonvolatiles to the mammalian vomeronasal organ.
Science 207:781-783.
- Wyvell CL, Berridge KC (2000) Intra-accumbens amphetamine
increases the conditioned incentive salience of sucrose reward:
enhancement of reward “wanting” without enhanced “liking” or
response reinforcement. *J. Neurosci.* 20, 8122-8130.
- Xu F, Schaefer M, Kida I, Schaefer I, Liu N, Rothman DL, Hyder F,
Restrepo D, Sheperd GM (2005) Simultaneous activation of
mouse main and accessory olfactory bulbs by odors or
pheromones. *J Comp Neurol.* 489:491-500.

- Yamaguchi T, Inamura K, Kashiwayanagi M (2000) Increases in Fos-immunoreactivity after exposure to a combination of two male urinary components in the accessory olfactory bulb of the female rat. *Brain Res* 876:211-214.
- Yamazaki K, Beauchamp GK, Curran M, Bard J, Boyse EA (2000) Parent-progeny recognition as a function of MHC odortype identity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(19):10500-2.
- Yamazaki K, Beacuham GK, Wysocki CG, Bard J, Thomas L, Boyse EA (1983) Recognition of H2 types in relation to the blocking of pregnancy in mice. *Science.* 221: 186-188.
- Yamazaki K, Boyse EA, Mike V, Thaler HT, Mathieson BJ, Abbot J, Boyse J, Zayas ZA, Thomas L (1976) Control in mating preferences in mice by gens in the major histocompatibility complex. *Journal of the experimental medicine.* 144:1324-1335.
- Yang Z, Schank JC (2006) Menstrual synchrony pheromones: cause for doubt. *Human reproduction* 14(3):579-580;
- Yang Z, Schank JC (2006) Women do not synchronize their menstrual cycles. *Human Nature.* 17(4):433-47.
- Yoshida M, Yokoo H, Mizoguchi K, Kawahara H, Tsuda A, Nishikawa T, Tanaka M (1992) Eating and drinking cause increased dopamine release in the nucleus accumbens and ventral

tegmental area in the rat: measurement by in vivo microdialysis. *Neurosci Lett.* 139(1):73-6.

Young JM, Trask BJ (2007) V2R gene families degenerated in primates, dog and cow, but expanded in opossum. *Trends Genet.* 23(5):212-5.

Zarevics P, Setler PE (1979) Simultaneous rate-independent and rate-dependent assessment of intracranial self-stimulation: evidence for the direct involvement of dopamine in brain reinforcement mechanisms. *Brain Res.* 169(3):449-512.

Zhang JX, Sun L, Zhang JH, Feng ZY (2008) Sex- and gonad-affecting scent compounds and 3 male pheromones in the rat. *Chem Senses.* 33(7):611-21.

Zou Z, Buck LB (2006) Combinatorial effects of odorant mixes in olfactory cortex. *Science.* 311(5766):1477-81.

Zufall F, Kelliher KR, Leinders-Zufall T (2002) Pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons. *Microsc Res Tech.* 58(6):523.

Zufall F, Leinders-Zufall T (2007) Mammalian pheromone sensing. *Curr Opin Neurobiol.* 17(4):483-9. Review.