

Estudio de los factores que regulan el tamaño del cerebro y la neurogénesis adulta en un reptil, la lagartija parda (*Podarcis liolepis*)



Carlos Sampedro Sigalat

2015



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva

Facultad de Biología

**Estudio de los factores que regulan el tamaño
del cerebro y la neurogénesis adulta en un
reptil, la lagartija parda (*Podarcis liolepis*)**

Carlos Sampedro Sigalat

Unidad de Etología

Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva

Directores: Enrique Font Bisier, Ester Desfilis Barceló

Programa de doctorado: Biodiversidad y Biología Evolutiva

Tesis presentada por **Carlos Sampedro Sigalat** para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Valencia.

Firmado: Carlos Sampedro Sigalat

Tesis dirigida por los doctores:

- **Enrique Font Bisier**

Profesor Titular de Zoología. Facultad de Biología

Unidad de Etología – Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva

Universidad de Valencia

- **Ester Desfilis Barceló**

Profesora Agregada de Psicobiología.

Departament de Medicina Experimental. Universitat de Lleida.

Este trabajo ha sido financiado con una beca predoctoral de la Conselleria d'Educació i Ciència para el proyecto *Estudio de los factores que modulan el proceso de neurogénesis adulta en lacértidos (2002 - 2006)*

Agradecimientos:

En primer lugar quisiera agradecer el apoyo y la ayuda que siempre me han mostrado el conjunto de investigadores que forman y han formado parte de la Unidad de Etología del Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva. En especial, quisiera agradecer su apoyo a mis directores de tesis, Enrique Font y Ester Desfilis, que desde el primer momento confiaron en mí y de los que he aprendido muchísimo. Muchas gracias por vuestra dedicación, vuestra paciencia y todos los conocimientos que me habéis transmitido a lo largo de estos años. También agradezco su apoyo y amistad a mis compañeras y compañeros de la Unidad de Etología (Pau C., Guillem, Diana, Mar, Vicente, Pau M., Björn, Sergio, Quique, Elisa, Laure, Adrián). Gracias por vuestros ánimos y los buenos momentos que pasamos juntos durante todos estos años. Un fuerte abrazo para Cristina Sánchez Matamoros, cuya colaboración y esfuerzo ha sido esencial en este trabajo. Sólo trabajando contigo un investigador podría tener un buen recuerdo de horas y horas de trabajo montando series delante de un microtomo.

Quisiera agradecer también la inestimable ayuda de José Manuel García Verdugo, que desde el primer momento me abrió las puertas de la Unidad de Neurobiología Comparada del Instituto Cavanilles, y cedió gran parte del material esencial para la inmunocitoquímica en esta tesis. Agradecimientos también a Ulises Gómez-Pinedo por su ayuda en la inmunocitoquímica para el doble marcaje que realizamos en el Centro de Investigación Príncipe Felipe. Gracias también a mis compañeros en la Unidad de Neurobiología Comparada (Susana, Sara, Mauro, Almudena, Melissa,

Mario, Clara, Vivian, Laura...) que me hicieron sentir como parte del laboratorio.

Un especial agradecimiento para Miguel Payá, investigador principal de la Unidad de Farmacodinamia de la Facultad de Farmacia, en la que realicé los análisis hormonales para esta tesis, y a sus estudiantes, que me facilitaron mucho el trabajo. Agradecimientos también para Ximo Baixeras de la Unidad de Entomología del Instituto Cavanilles, en cuyo laboratorio realicé las mediciones de los cerebros. También para Carmen Rojo y Toñi Rodrigo de la Unidad de Limnología del Instituto Cavanilles, en cuyo laboratorio realicé gran parte de los recuentos de células marcadas con el microscopio, y a la amistad de sus estudiantes Mati y Jose. Por último, dar las gracias a todos los demás investigadores y técnicos del Instituto Cavanilles que puntualmente prestaron su ayuda cediendo sus espacios y materiales para esta tesis.

No puedo olvidarme de las amigas y amigos que han compartido vivencias conmigo durante la realización de esta tesis. Siempre me han apoyado en este largo camino. Un abrazo a Pedro, M^a Carmen, Jose, Bea, Rubén, Mario Alberto, Rafa, Sevilla, Olga, Laura, Tono, Viarany y *la gent d'Oliva*.

Para finalizar, un fuerte abrazo para mi familia, a los que agradezco su apoyo, paciencia, consejo y cariño incondicional durante todos estos años. Gracias por estar siempre a mi lado en los buenos y malos momentos.

Índice

SECCIÓN I. INTRODUCCIÓN GENERAL	5
Capítulo 1. Introducción al estudio de los factores que regulan el tamaño del cerebro y la neurogénesis adulta en los vertebrados.	7
1.1 La neurogénesis adulta	9
1.2 Factores que regulan la neurogénesis adulta en los vertebrados	14
1.3 Influencia del sexo, la estacionalidad y las hormonas en el tamaño del cerebro y la neurogénesis adulta en los vertebrados	17
Capítulo 2. La neurogénesis adulta en la lagartija parda (<i>Podarcis liolepis</i>).	
Objetivos de la tesis	51
2.1 La neurogénesis adulta en los reptiles	53
2.2 Factores que regulan la neurogénesis adulta en los reptiles	60
2.3 Objetivos de la tesis	61
SECCIÓN II. METODOLOGÍA	69
Capítulo 3. Material y Métodos	71
3.1 Metodología	73
3.2 Análisis estadísticos	84

SECCIÓN III. RESULTADOS	89
Capítulo 4. Dimorfismo sexual en el tamaño del cerebro y la neurogénesis adulta en <i>P. liolepis</i>	91
4.1 Introducción	93
4.2 Objetivos	95
4.3 Resultados	99
4.4 Discusión	111
Capítulo 5. Estacionalidad en el tamaño del cerebro y la neurogénesis adulta en <i>P. liolepis</i>	123
5.1 Introducción	125
5.2 Objetivos	129
5.3 Resultados	129
5.4 Discusión	139
Capítulo 6. Migración de las nuevas células en el telencéfalo de <i>P. liolepis</i>: Influencia del sexo y la estacionalidad	147
6.1 Introducción	149
6.2 Objetivos	153
6.3 Resultados	155
6.4 Discusión	161

SECCIÓN IV. CONCLUSIONES FINALES	165
Capítulo 7. Discusión general y conclusiones	167
7.1 Discusión general	169
7.2 Conclusiones	175
SECCIÓN V. REFERENCIAS	179

Sección I

Introducción general

**Introducción al estudio
de los factores que regulan
el tamaño del cerebro y
la neurogénesis adulta
en los vertebrados.**

cap. 1

1.1 La neurogénesis adulta

Desde los inicios de la neurobiología moderna, la existencia de plasticidad en el cerebro adulto ha suscitado un intenso debate entre los neurobiólogos. Durante largo tiempo se ha mantenido que la estructura del cerebro adulto debía ser estática para garantizar la permanencia a largo plazo de la información almacenada (e.g. Eckenhoff & Rakic, 1988). Hoy en día, sin embargo, se concibe el cerebro adulto como un órgano esencialmente plástico, que desarrolla y redefine su estructura en respuesta al ambiente y a las demandas funcionales. El cerebro adulto se ajusta al ambiente cambiante a través de la regulación de múltiples procesos celulares desde la expresión génica, la síntesis de neurotransmisores y receptores celulares, la arborización dendrítica, la axogénesis, la sinaptogénesis, la gliogénesis y la neurogénesis adulta (Kempermann, 2006). La *neurogénesis adulta* consiste en la producción de nuevas neuronas y su incorporación a circuitos funcionales en el cerebro adulto. Parte de la plasticidad que muestra el cerebro adulto depende de la neurogénesis adulta, ya que las nuevas neuronas crean nuevas conexiones que modifican los circuitos preexistentes y la acumulación de estas nuevas neuronas contribuye al crecimiento del cerebro adulto (Tramontin & Brenowitz, 2000; Font *et al.*, 2001; Kempermann, 2006; Gheusi & Lledo, 2007; Kaslin *et al.*, 2008; Barker *et al.*, 2011; Paredes *et al.*, 2015).

El descubrimiento de la neurogénesis adulta es relativamente reciente. Durante más de cien años se asumió que la neurogénesis era un proceso restringido a la etapa embrionaria y ausente en el cerebro adulto (Ramón y Cajal, 1913; Gross, 2000). Esta creencia ha ido abandonándose en las últimas

décadas, ya que numerosos estudios han demostrado que realmente el cerebro adulto continúa produciendo nuevas neuronas (Altman, 1962; Kaplan & Hinds, 1977; Bayer, 1982; Goldman & Nottebohm, 1983; Reynolds & Weiss, 1992; Corotto *et al.*, 1993; Gross, 2000). Hoy en día, la neurogénesis adulta se ha demostrado de forma convincente en una gran variedad de especies pertenecientes a distintos taxones, tanto invertebrados como vertebrados (revisado en Tramontin & Brenowitz, 2000; Font *et al.*, 2001; Kempermann, 2006; Kaslin *et al.*, 2008; Barker *et al.*, 2011; Paredes *et al.*, 2015).

En los vertebrados adultos existen importantes diferencias en cuanto a los lugares de nacimiento y destino de las nuevas neuronas (Fig. 1.1). En los mamíferos se reconocen principalmente dos regiones neurogénicas: la zona subventricular de los ventrículos laterales, que genera neuronas destinadas a los bulbos olfativos, y la zona subgranular del hipocampo, que genera neuronas destinadas al giro dentado (Altman & Das, 1965; Altman, 1969; Kaplan & Hinds, 1977; Corotto *et al.*, 1993). También se ha observado neurogénesis adulta en el neocórtex, el estriado y la amígdala de los mamíferos, aunque en estas áreas la evidencia es más controvertida (Gould *et al.*, 2007). En las aves se observa proliferación celular en distintos puntos (“hot spots”) de los ventrículos laterales, que producen neuronas que se incorporan a un gran número de áreas telencefálicas (Goldman & Nottebohm, 1983; Alvarez-Buylla *et al.*, 1990, 1994). En los reptiles, la proliferación celular es muy abundante en la pared de los ventrículos laterales, principalmente en las áreas sulcales, que producen neuronas destinadas a numerosas áreas telencefálicas (revisado en Font *et al.*, 2001; Delgado-González *et al.*, 2008;

Maine *et al.*, 2014). Fuera del telencéfalo también se ha descrito neurogénesis en el cerebelo, el área preóptica y el hipotálamo, aunque no en todos los reptiles estudiados y en menor proporción que en los ventrículos laterales (Pérez-Cañellas & García-Verdugo, 1992; Pérez-Cañellas *et al.*, 1997; Maine *et al.*, 2014). Por último, en los anfibios y los peces, la proliferación celular se halla muy extendida a lo largo del eje rostrocaudal del cerebro, desde los bulbos olfativos al rombencéfalo (Ekström *et al.*, 2001; Zupanc *et al.*, 2005; Grandel *et al.*, 2006; Raucci *et al.*, 2006). El estudio de las diferencias y semejanzas en la extensión e intensidad de la neurogénesis adulta entre distintos grupos de vertebrados y entre distintas especies dentro de cada grupo puede ayudar a identificar los principales cambios evolutivos que se han producido, las presiones de selección implicadas y el posible valor adaptativo de este fenómeno.

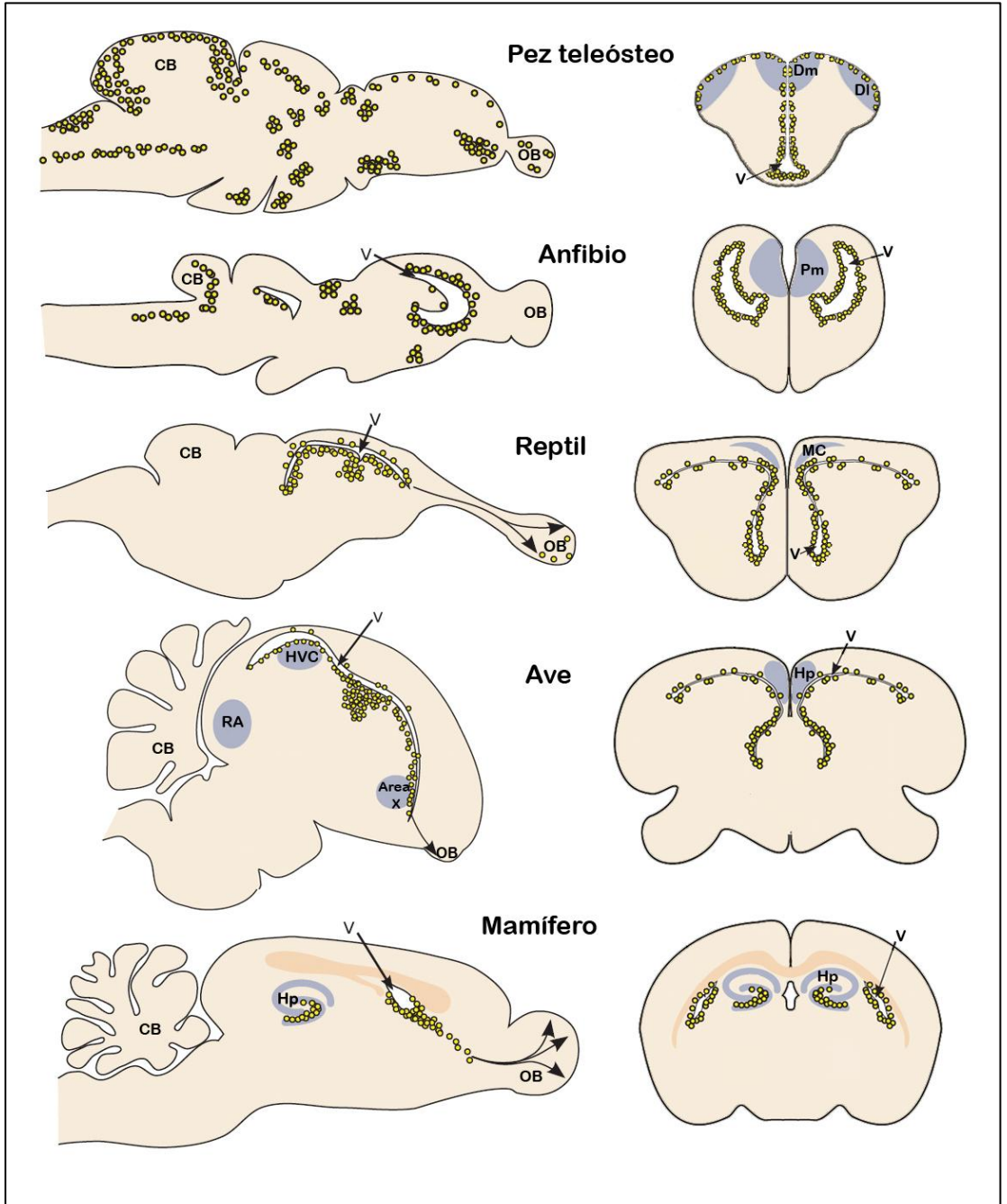


Figura 1.1 (página 12) Secciones sagitales (izquierda) y transversales (derecha) esquematizadas de cerebros de vertebrados adultos mostrando las zonas donde se generan nuevas células. En reptiles, aves y mamíferos se muestra además la migración de las nuevas células a los bulbos olfativos (OB). Las áreas en azul son núcleos del circuito implicado en la producción del canto de las aves [*high vocal center* (HVC), núcleo robusto del arcopallio (RA) y Área X] y áreas cerebrales esenciales para la memoria espacial (Dm: palio dorsomedial; Dl: palio dorsolateral; Pm, palio medial; MC, córtex medial; Hp, hipocampo). CB, cerebelo; V, ventrículo. Modificado a partir de Barker *et al.*, 2011.

1.2 Factores que regulan la neurogénesis adulta en los vertebrados

Una de las características que han llevado a los científicos a pensar que la neurogénesis adulta sirve a una función y no es simplemente un remanente no funcional de la neurogénesis embrionaria, es que la neurogénesis adulta responde a la regulación de numerosos factores (Kempermann, 2011). Estos factores actúan en numerosos niveles, desde el nivel molecular a niveles supraorganísmicos (Fig. 1.2). La regulación de la neurogénesis adulta es un proceso altamente complejo, por el gran número de factores implicados y porque muchos factores ejercen su acción en múltiples niveles, interaccionan entre sí o actúan a través de otros (Kempermann *et al.*, 2011). Para facilitar su estudio a menudo los factores se organizan en modelos jerarquizados, en los que los factores se ordenan en niveles, pero que son claras simplificaciones del proceso de regulación de la neurogénesis adulta (Fig. 1.2).

La mayoría de las líneas de investigación que estudian la regulación de la neurogénesis adulta se han centrado principalmente en mamíferos y aves. Estos estudios han revelado que la neurogénesis adulta es regulada a nivel molecular y celular, entre otros, por la matriz extracelular, factores neurotróficos (e.g. *brain-derived neurotrophic factor*, BDNF), factores de crecimiento (e.g. *fibroblast growth factor 2*, FGF2), neurotransmisores (e.g. serotonina), hormonas (e.g. testosterona) y células gliales. También el sexo y la edad influyen en la neurogénesis adulta, así como factores relacionados con la interacción del organismo con el ambiente como el fotoperiodo, la temperatura ambiental, el estrés, los estímulos sociales, el aprendizaje, los

niveles de actividad física o la complejidad del medio (revisado en Kempermann *et al.*, 2011). Estos factores producen efectos muy variados sobre las distintas fases del proceso de neurogénesis (i.e. la proliferación de precursores neuronales en la zona ventricular, la migración de neuroblastos, la diferenciación en neuronas y la incorporación a circuitos funcionales; Tabla 1.1; revisado en Tramontin & Brenowitz, 2000; Gage & van Praag, 2002; Kempermann, 2006, 2011; Meitzen & Thompson, 2008).

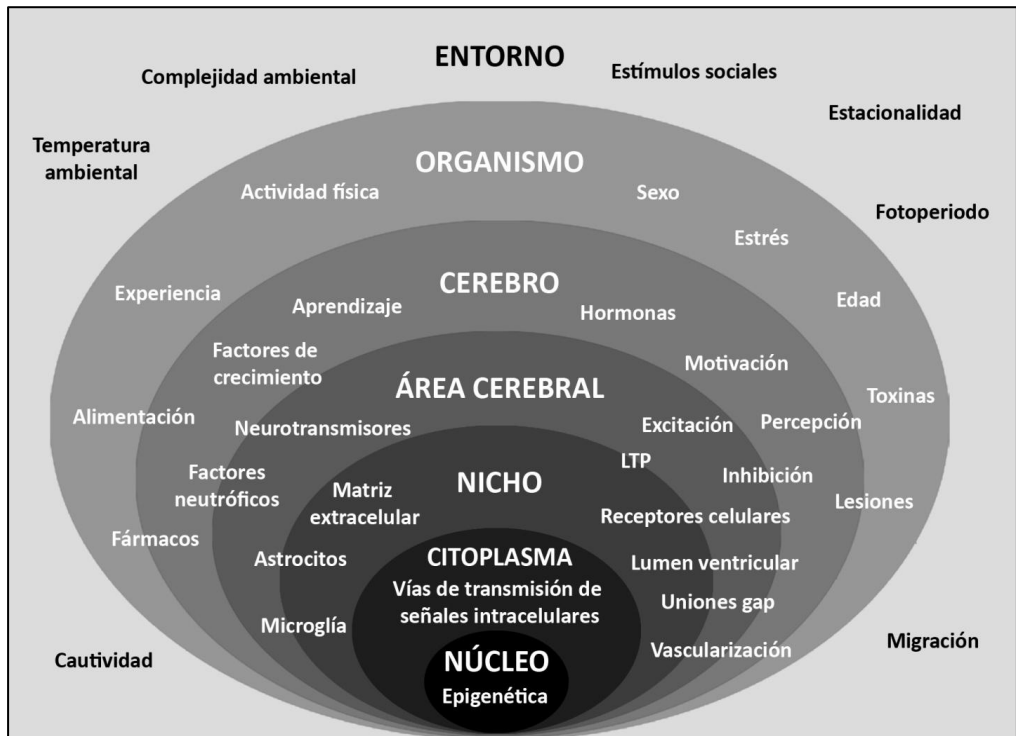


Figura 1.2 Principales factores que regulan la neurogénesis adulta jerarquizados en niveles (modificado a partir de Kempermann *et al.*, 2011).

Tabla 1.1 Regulación de la neurogénesis adulta en los vertebrados*

Factor	Área cerebral	Grupo Zoológico	Efecto en la neurogénesis adulta	Referencias
sexo	cerebelo	peces cebra (<i>Danio rerio</i>)	los machos reclutan más neuronas que las hembras	Ampatzis & Dermon, 2007
estacionalidad	área preóptica	ranas ♂ (<i>Rana temporaria</i>)	aumenta la proliferación celular en la primavera	Chetverukhin & Polenov, 1993
altos niveles de testosterona	amígdala	topillos ♂ (<i>Microtus pennsylvanicus</i>)	estimula la proliferación celular	Fowler <i>et al.</i> , 2003
exposición repetida a estradiol	hipocampo	ratas ♀ (<i>Rattus norvegicus</i>)	disminuye la supervivencia de las nuevas neuronas	Barker & Galea, 2008
estrés	hipocampo	simios ♂ (<i>Callithrix jacchus</i>)	inhibe la proliferación celular	Gould <i>et al.</i> , 1998
exposición crónica a la corticosterona	HVC	aves canoras ♂ (<i>Melospiza melodia</i>)	inhibe la proliferación celular	Newman <i>et al.</i> , 2010
fotoperiodos cortos	SVZ	hámsters ♂ (<i>Mesocricetus auratus</i>)	estimula la proliferación celular	Huang <i>et al.</i> , 1998
bajas temperaturas	RMS	lagartos ♂ (<i>Psammodromus algirus</i>)	inhibe la migración de las nuevas células al bulbo olfativo	Peñafiel <i>et al.</i> , 2001
complejidad ambiental	núcleo marcapasos	peces eléctricos ♂ (<i>Brachyhypopomus gauderio</i>)	estimula la proliferación celular	Dunlap <i>et al.</i> , 2011
exposición a nuevos olores	MOB	ratones ♂ (<i>Mus musculus</i>)	estimula la supervivencia de las nuevas neuronas	Rocheffort <i>et al.</i> , 2002
actividad física	hipocampo	ratones ♀ (<i>Mus musculus</i>)	estimula prolif. celular y superviv.	van Praag <i>et al.</i> , 1999b
aprendizaje espacial	hipocampo	aves que almacenan alimento (<i>Parus palustris</i>)	estimula la proliferación celular	Patel <i>et al.</i> , 1997
cautividad	telencéfalo	lagartos ♂ (<i>Gallotia galloti</i>)	inhibe la proliferación celular	Delgado-González <i>et al.</i> , 2008

*Este listado de factores no es exhaustivo, únicamente pretende mostrar una visión general de la regulación de la neurogénesis adulta en los vertebrados.

HVC, high vocal center; MOB, bulbo olfativo principal; RMS, torrente migratorio rostral; SVZ, zona subventricular.

1.3 Influencia del sexo, la estacionalidad y las hormonas en el tamaño del cerebro y la neurogénesis adulta en los vertebrados

El objetivo principal de la tesis consiste en identificar factores que regulan el tamaño del cerebro y la neurogénesis adulta en los reptiles. El sexo, la estacionalidad y las hormonas esteroides son algunos de los principales factores que regulan la neurogénesis adulta en otros vertebrados (e.g. Kirn *et al.*, 1994; Rasika *et al.*, 1994; Tanapat *et al.*, 1999; Peretto *et al.*, 2001; Galea, 2008; Dunlap *et al.*, 2011). A continuación revisamos la información disponible sobre tres modelos bien conocidos de animales vertebrados con áreas y sistemas cerebrales sexualmente dimórficos y/o que manifiestan cambios estacionales en tamaño y neurogénesis adulta asociados a comportamientos estacionales. Estas áreas y sistemas cerebrales son el sistema neural de control del canto de las aves, el hipocampo y el sistema vomeronasal de distintos vertebrados. Al final de este capítulo, en las Tablas 1.2–1.6, podemos encontrar más ejemplos de neurogénesis sexualmente dimórfica o estacional.

1.3.1 El sistema neural de control del canto de las aves

Prácticamente todas las aves pueden generar vocalizaciones, pero un grupo de passeriformes, compuesto por unas 4000 especies conocidas con el nombre de aves canoras (Oscines, Passeri), producen además cantos prolongados y complejos. Las aves canoras aprenden los cantos durante el

primer año de vida (Thorpe, 1958; Konishi, 1965a,b). Estos cantos permanecen invariables a lo largo de la vida en muchas aves canoras (*closed-learners*), pero algunas especies además son capaces de crear nuevos cantos durante el estado adulto e incluso modificarlas estacionalmente (*open-learners*; Konishi, 1965a,b; Brainard & Doupe, 2002; Catchpole & Slater, 2008). Los cantos más complejos se emiten durante la estación reproductiva y sirven dos funciones principales: (1) delimitar el territorio y ahuyentar de él a otras aves (tanto los machos como las hembras utilizan el canto en este contexto); (2) los machos de muchas especies además utilizan el canto para atraer y cortejar a las hembras, estimulando su comportamiento reproductivo (Kroodsma & Miller, 1996).

El órgano encargado de la producción del canto es la siringe, en la bifurcación de la tráquea. La actividad de los músculos de la siringe, y en general, la producción del canto, es regulada por una red de núcleos cerebrales interconectados que en conjunto reciben el nombre de sistema neural de control del canto. El sistema neural de control del canto consta de tres vías interconectadas que se encargan respectivamente de la producción, la percepción y el aprendizaje del canto (Nottebohm *et al.*, 1976; Nottebohm & Liu, 2010; Fig. 1.3). El núcleo cerebral en el que confluyen las tres vías de esta red es el HVC (antes conocido como *high/higher vocal center* – centro vocal superior –, ahora el acrónimo se utiliza como nombre propio), localizado en el nidopalio (Nottebohm *et al.*, 1976; Reiner *et al.*, 2004; The Avian Brain Nomenclature Consortium, 2005). El HVC recibe proyección del nidopalio auditivo (Field L), proyecta al núcleo robusto del arcopalio (RA) en la vía

motora, y proyecta al Área X del estriado medial, implicada en el aprendizaje del canto (Nottebohm *et al.*, 1976; Brenowitz *et al.*, 1997; Fig. 1.3).

Dimorfismo sexual en el sistema de control del canto de las aves

En 1976, Nottebohm & Arnold descubrieron que algunos núcleos cerebrales del canto de los canarios (*Serinus canaria*) y los pinzones cebrá (*Taeniopygia guttata*) eran sexualmente dimórficos en tamaño. El HVC y el RA eran entre tres y cinco veces más grandes en machos que en hembras, y el Área X sólo pudo hallarse en los machos (Nottebohm & Arnold, 1976). Tras este experimento se han descrito una gran variedad de cantos asociados a distintos grados de dimorfismo sexual en el sistema de control del canto. El canto varía entre hembras de distintas especies en frecuencia, complejidad y estereotipia. Las hembras de la mayoría de las especies no cantan nunca o cuando raramente lo hacen, su canto es menos complejo y estereotipado que el de los machos (e.g. gorriones, *Zonotrichia leucophrys*; Baker *et al.*, 1984; Baptista *et al.*, 1993). Sin embargo, las hembras de algunas especies (e.g., reyezuelos, *Thryothorus leucotis*) forman duetos con los machos, en los que ambos sexos producen cantos con una frecuencia y complejidad similar (Brenowitz *et al.*, 1985). De la misma manera varía el dimorfismo sexual en el volumen de núcleos del canto como el HVC, el RA o el Área X (revisado en Ball *et al.*, 2008). Estos núcleos son más grandes en machos que en hembras en las especies que las hembras exhiben menor frecuencia, complejidad y/o estereotipia en el canto que los machos (e.g. en pinzones cebrá, Nottebohm &

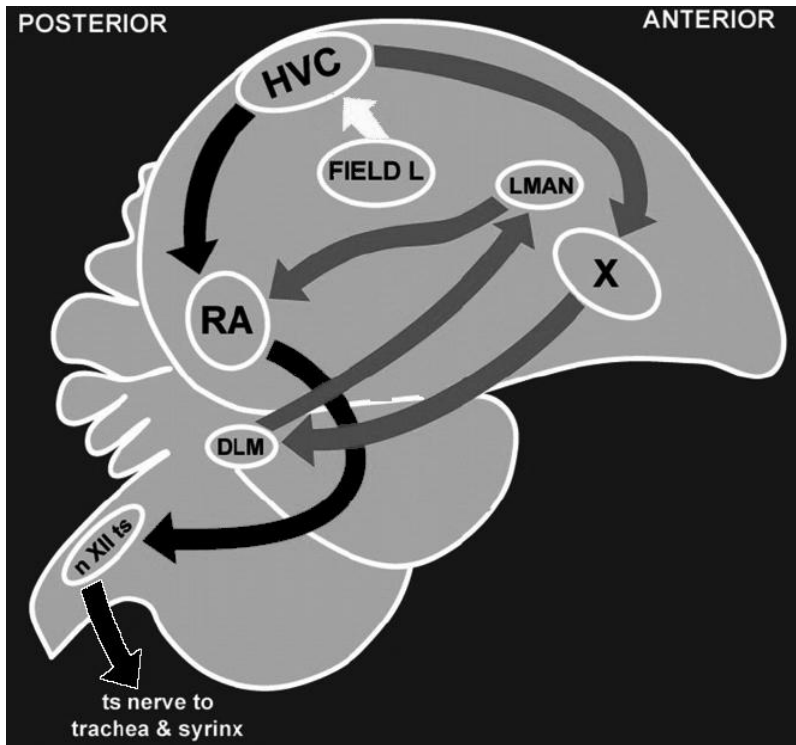


Figura 1.3 Esquema de las principales vías y núcleos cerebrales que componen el sistema del canto de las aves canoras. Línea negra, vía motora; línea gris, vía del aprendizaje del canto; línea blanca, vía auditiva. HVC, antes *high/higher vocal center*; RA, núcleo robusto del arcopallio; X, Área X de los ganglios basales; LMAN, parte lateral del núcleo magnocelular del nidoplio anterior; DLM, porción medial del núcleo talámico dorsolateral; nXII_{ts}, parte traqueosiringea del núcleo hipoglosal; Field L, nidoplio auditivo. Figura modificada de Nottebohm & Liu, 2010.

Arnold, 1976); sin embargo, estos núcleos tienen tamaños similares entre los sexos en aquellas especies en las que las hembras forman duetos con los machos y sus cantos son similares (e.g. en *T. leucotis*; Brenowitz *et al.*, 1985).

En los pinzones cebra (*closed-learners*), los andrógenos, transformados en estrógenos, son responsables de la masculinización del sistema de control del canto durante la primera semana tras la eclosión (acción organizadora de los andrógenos; Gurney & Konishi, 1980; Nordeen *et al.*, 1992; Adkins-Regan *et al.*, 1994; revisado en Wade & Arnold, 2004). Posteriormente, los andrógenos activan el canto en los machos adultos (acción activadora). La acción temprana de los esteroides afecta al tamaño y el número de neuronas en las regiones cerebrales de los pinzones cebra, mientras que en el adulto aumentan la arborización dendrítica de las neuronas (Gurney & Konishi, 1980; DeVoogd & Nottebohm, 1981; Kirn & DeVoogd, 1989; Konishi & Akutagawa, 1990; Burek *et al.*, 1995). En los canarios (*open-learners*), los núcleos del sistema de control del canto siguen siendo plásticos en el adulto. El tratamiento con andrógenos en los canarios adultos provoca el crecimiento de algunos núcleos cerebrales del canto y los induce a cantar (Nottebohm, 1980; Rasika *et al.*, 1994; Madison *et al.*, 2014).

Estacionalidad en el sistema de control del canto de las aves

En las aves canoras que habitan climas templados, los machos cantan principalmente durante la estación reproductiva, y sus cantos en esta estación son más complejos y estereotipados (Nottebohm *et al.*, 1986; Brenowitz, 1997). Relacionado con esta variación estacional en la producción,

complejidad y/o estereotipia del canto, el sistema neural de control del canto manifiesta también importantes cambios a lo largo del ciclo anual (Tramontin & Brenowitz, 2000). El fotoperiodo determina el inicio de la estación reproductiva y promueve el desarrollo del sistema del canto (Dawson *et al.*, 2001; Sharp, 2005). A principios de la primavera, el aumento de horas de luz estimula la secreción de testosterona y sus metabolitos activos (estradiol, 5- α -dihidrotestosterona) que a su vez promueven el crecimiento estacional de varios núcleos cerebrales del canto (Nottebohm, 1981; Kirn *et al.*, 1989; Brenowitz *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1995, 1997a,b; Smith, 1996; Gullledge & Deviche, 1997; Absil *et al.*, 2003; Tramontin *et al.*, 2003; Soma *et al.*, 2004; Hurley *et al.*, 2008).

En algunos núcleos del canto como el RA, los esteroides sexuales estimulan el crecimiento estacional aumentando el tamaño de los somas y los árboles dendríticos de las neuronas (De Voogd & Nottebohm, 1981; Hill & DeVoogd, 1991; Smith *et al.*, 1997c; Tramontin *et al.*, 1998). En otros núcleos como el HVC y el Área X, los cambios estacionales en volumen se deben a la adición estacional de neuronas (Goldman & Nottebohm, 1983; Álvarez-Buylla & Kirn, 1997; Smith *et al.*, 1997c; Tramontin & Brenowitz, 1999). El HVC adulto incorpora continuamente interneuronas y neuronas que proyectan al RA sustituyendo neuronas más viejas (Kirn & Nottebohm, 1993). Esta sustitución de neuronas está regulada estacionalmente y es mayor fuera de la estación reproductiva (Kirn *et al.*, 1994; Tramontin & Brenowitz, 1999). A principios de la primavera la testosterona y sus metabolitos estimulan la supervivencia y la acumulación de las nuevas neuronas en el HVC, aumentando su número total

y contribuyendo al crecimiento en volumen (Kirn *et al.*, 1994; Nottebohm *et al.*, 1994; Rasika *et al.*, 1994; Hidalgo *et al.*, 1995; Meitzen & Thompson, 2008).

Tras el apareamiento, los largos fotoperiodos estivales marcan el final de la época reproductiva induciendo la regresión de las gónadas y disminuyendo los niveles circulantes de esteroides (Nicholls *et al.*, 1988). La testosterona se inactiva transformada en 5- β -dihidrotestosterona (Bottoni & Massa, 1981), desciende la producción de receptores de andrógenos y estrógenos en el cerebro (Gahr & Metzdorf, 1997; Soma *et al.*, 1999; Fusani *et al.*, 2000) y disminuye la sensibilidad de los núcleos del canto a la testosterona (Bernard & Ball, 1997). Con la llegada del otoño, los cantos emitidos son menos frecuentes, complejos y estereotipados (Nottebohm *et al.*, 1986). Los fotoperiodos decrecientes estimulan la muerte celular en los núcleos del canto (Kirn *et al.*, 1994; Kirn & Schwabl, 1997). El HVC se atrofia a consecuencia del descenso en el número de neuronas y el RA decrece por la reducción en los campos dendríticos (Nottebohm, 1981; Hill & DeVoogd, 1991; Thompson *et al.*, 2007; Meitzen & Thompson, 2008).

1.3.2 El hipocampo

El hipocampo es un área telencefálica que participa en la formación de la memoria a largo plazo (Scoville & Milner, 1957; Squire, 2009) y en la codificación de la información espacial para construir mapas cognitivos, por lo que se considera esencial para el comportamiento espacial (O'Keefe & Nadel, 1978; Rodríguez *et al.*, 2002). El hipocampo es, junto a los bulbos olfativos,

una de las pocas áreas cerebrales que incorpora neuronas continuamente a lo largo de la vida en los mamíferos (Altman & Das, 1965; Kaplan & Hinds, 1977; Kempermann, 2006). En otros vertebrados, el comportamiento y la memoria espacial dependen de áreas cerebrales homólogas como son la formación hipocámpica (o hipocampo) en las aves, el córtex medial en los reptiles, el palio medial en los anfibios o el palio dorsomedial en los peces (revisado en Rodríguez *et al.*, 2002; Butler & Hodos, 2005). Estas áreas cerebrales también incorporan neuronas en abundancia en los adultos (Barker *et al.*, 2011; Fig. 1.1). La abundante y extendida producción de neuronas en áreas espaciales en los vertebrados adultos sugiere que la neurogénesis adulta podría jugar un importante papel en el comportamiento y la memoria espacial (Barker *et al.*, 2011; Barnea & Pravosudov, 2011).

El tamaño y la neurogénesis adulta en el hipocampo a menudo son sexualmente dimórficos y/o varían estacionalmente. Esta variación se ha relacionado con diferencias sexuales y cambios estacionales en el comportamiento espacial. A continuación estudiamos algunos grupos en los que se ha descrito variación sexual y estacional en el tamaño y/o la neurogénesis adulta en el hipocampo: las aves parásitas, las aves y los mamíferos que almacenan alimento, y los roedores. En las Tablas 1.2 – 1.6 al final de este capítulo podemos encontrar más ejemplos de neurogénesis hipocámpica sexualmente dimórfica o estacional.

El hipocampo de las aves parásitas

Las hembras de muchas especies del género *Molothrus* (Icteridae) parasitan puestas durante la estación reproductiva (Hahn, 1941; Rothstein *et al.*, 1987). Cuando una hembra está preparada para poner un huevo, debe escoger entre los nidos de hospedadores potenciales localizados en su espacio doméstico. Únicamente aquellos nidos en los que la hembra hospedadora esté poniendo sus propios huevos en ese momento pueden ser parasitados con éxito (Scott & Ankney, 1983). Los nidos de los hospedadores, por tanto, sólo son vulnerables durante un breve periodo de tiempo, por lo que el parasitismo de nidos requiere no sólo de grandes demandas de procesamiento de información espacial para localizar los nidos y volver a ellos para la puesta, sino también episódica, para volver únicamente a aquellos nidos en estado de vulnerabilidad. Este complejo almacenamiento de memoria espacial y episódica lo lleva a cabo el hipocampo (Sherry & Vaccarino, 1989; Hampton & Shettleworth, 1996; Patel *et al.*, 1997).

El parasitismo de nidos presenta cierta variabilidad entre las especies del género *Molothrus*. Por ejemplo, las especies *M. ater* y *M. bonariensis* son parásitos obligados de nidos, con aproximadamente 200 especies hospedadoras, y un fuerte dimorfismo sexual en comportamiento, ya que únicamente las hembras buscan nidos hospedadores para sus huevos (Friedmann & Kiff, 1985; Mason, 1987). La especie *M. rufoaxillaris*, en cambio, parasita a una única especie hospedadora (*M. badius*) y ambos sexos participan en la localización de los nidos de hospedadores (Mason, 1987; Fraga, 1991). La variación sexual en el parasitismo de nidos en *Molothrus* va

asociada a un dimorfismo sexual en el tamaño del hipocampo. Sólo en las especies parásitas cuyos sexos difieren en comportamiento, el hipocampo es mayor en las hembras que en los machos (Sherry *et al.*, 1993; Reborada *et al.*, 1996; Astié *et al.*, 1998). El hipocampo además crece durante la estación reproductiva, cuando el parasitismo de nidos se activa y las demandas de memoria espacial aumentan (Clayton *et al.*, 1997; Day *et al.*, 2008).

El hipocampo de los animales que almacenan alimento

Aves que almacenan alimento

Algunas aves, principalmente páridos (i.e. carboneros y herrerillos) y córvidos, sobreviven en épocas de escasez de alimento con las semillas e insectos que almacenan en numerosos lugares de su espacio doméstico (Sherry & Hoshoooley, 2007). El comportamiento de almacenamiento de alimento requiere grandes demandas de procesamiento de información espacial y temporal en el hipocampo, ya que cada vez que las aves almacenan o retiran alimento deben actualizar su registro de almacenamiento (Sherry & Vaccarino, 1989). Los páridos y los córvidos se caracterizan por tener grandes hipocampos en relación a otras paseriformes que no almacenan alimento (Krebs *et al.*, 1989; Sherry *et al.*, 1989; Healy & Krebs, 1992, 1996; Hampton *et al.*, 1995; Gould *et al.*, 2013), lo que sugiere que la presión selectiva por mayores capacidades espaciales en estas aves habría favorecido un aumento en el tamaño del hipocampo (Krebs, 1990; Sherry *et al.*, 1992; Basil *et al.*, 1996; Garamszegi & Eens, 2004; Healy *et al.*, 2005; de Kort & Clayton, 2006; Gould *et al.*, 2013).

El hipocampo de los páridos manifiesta además cambios estacionales en tamaño y niveles de neurogénesis (revisado en Sherry & Hoshoooley, 2009, 2010). Algunos estudios localizan los máximos en tamaño y neurogénesis del hipocampo en otoño, coincidiendo con el pico estacional en almacenamiento de alimento (Barnea & Nottebohm, 1994; Smulders *et al*, 1995). Otros estudios los ubican en invierno, cuando las aves son más dependientes de la memoria espacial para localizar el alimento almacenado (Hoshoooley & Sherry, 2007; Hoshoooley *et al.*, 2007). El crecimiento estacional del hipocampo es en parte consecuencia del aumento en el número de neuronas (Smulders *et al.*, 2000; Hoshoooley & Sherry, 2007). El fotoperiodo y la experiencia en el almacenamiento de alimento se han sugerido como posibles factores que regulan la plasticidad estacional del hipocampo en los páridos. La manipulación del fotoperiodo en el laboratorio no tiene efecto directo en el tamaño del hipocampo o en el reclutamiento de neuronas (Krebs *et al.*, 1995; MacDougall-Shackleton *et al.*, 2003; Hoshoooley *et al.*, 2005). Sin embargo, los fotoperiodos decrecientes del otoño estimulan el comportamiento de almacenamiento de alimento (Krebs *et al.*, 1995; Shettleworth *et al.*, 1995; Clayton & Cristol, 1996; McDougall-Shackleton *et al.*, 2003), y esta experiencia en el almacenamiento de alimento estimula el crecimiento y la neurogénesis del hipocampo (Patel *et al.*, 1997).

Ardillas

Las ardillas grises (*Sciurus carolinensis*, Sciuridae) acumulan estacionalmente reservas de alimento: recolectan y almacenan nueces en

centenares de localizaciones durante el otoño y dependen de la memoria espacial para recuperarlas en el invierno (Thompson & Thompson, 1980; Jacobs & Liman, 1991). Esta estrategia de almacenamiento de alimento requiere de una gran plasticidad hipocámpica, como parecen indicar los altos niveles de proliferación celular en el hipocampo de esta especie en comparación con otros esciúridos que almacenan alimento en unas pocas despensas (Barker *et al.*, 2005). Estas ardillas además son reproductores estacionales (Thompson, 1977). Los machos tienen espacios domésticos más grandes que las hembras durante todo el año (Thompson, 1978), pero esta diferencia se acentúa durante la estación reproductiva (Thompson, 1977). Como en las aves parásitas, los hipocampos de las ardillas son sexualmente dimórficos (el volumen del campo CA1 es mayor en machos que en hembras), lo que sugiere que existe una relación causal entre el tamaño del hipocampo y el uso del espacio doméstico en cada sexo (Lavenex *et al.*, 2000a). Sin embargo, a pesar de que las ardillas se reproducen y almacenan alimento estacionalmente, sus hipocampos no varían estacionalmente en volumen, número de neuronas o neurogénesis, a diferencia de las aves que almacenan alimento (Lavenex *et al.*, 2000a,b).

El hipocampo de los roedores

Ratas

Los hipocampos de las ratas (*Rattus norvegicus*) macho y hembra difieren en volumen, conectividad, morfología, así como en el número de neuronas (Gould *et al.*, 1990; Roof & Havens, 1992; Parducz & García-Segura,

1993; Madeira & Liebermann, 1995; Nuñez *et al.*, 2000). Estos dimorfismos se originan perinatalmente debido al efecto de los andrógenos (Roof, 1993; Bowers *et al.*, 2010). En el hipocampo de los adultos, además, la neurogénesis es sexualmente dimórfica. Las hembras de las ratas producen más neuronas que los machos en la zona subgranular del giro dentado, mientras que en los machos sobreviven una mayor proporción de estas neuronas que acaban incorporándose a la capa granular (Fig. 1.4; Tanapat *et al.*, 1999; Galea, 2008). En los machos adultos, los andrógenos estimulan la supervivencia y el reclutamiento de neuronas; sin embargo, el reclutamiento de neuronas no es mayor que la pérdida de neuronas por muerte celular y el tamaño del hipocampo permanece constante (Spritzer & Galea, 2007; Barker & Galea, 2008). En las hembras adultas, la neurogénesis adulta varía con el ciclo estral (Pawluski *et al.*, 2009). El aumento en los niveles de estradiol en la fase de proestro estimula inicialmente la proliferación celular en las hembras (Tanapat *et al.*, 1999; Ormerod *et al.*, 2003); sin embargo, la exposición prolongada al estradiol suprime a largo plazo la proliferación celular y la supervivencia de las nuevas neuronas, que desciende durante la fase de estro (Barker & Galea, 2008). La corticosterona y la progesterona estimulan este efecto supresor del estradiol sobre la neurogénesis hipocámpica (Ormerod *et al.*, 2003; Tanapat *et al.*, 2005).

Los estudios con ratas discrepan en si los dimorfismos sexuales en el hipocampo se corresponden o no con distintas habilidades espaciales (e.g. McCarthy & Konkle, 2005). La mayoría de estudios muestran que los machos tienen mayores habilidades espaciales que las hembras, como predecirían sus

hipocampos más grandes (e.g. Roof & Havens, 1992; Bucci *et al.*, 1995; Jonasson, 2005). Sin embargo, otros han descrito mayores habilidades espaciales en las hembras (e.g. Perrot-Sinal *et al.*, 1996) o la ausencia de diferencias sexuales (e.g. Healy *et al.* 1999). Estas habilidades espaciales dependen de los niveles hormonales. En los machos, los andrógenos, transformados localmente en estradiol, estimulan las habilidades espaciales (Spritzer *et al.*, 2011). En las hembras, distintos estudios discrepan en si los estrógenos estimulan o inhiben las habilidades espaciales de las hembras, o en qué fases del ciclo estral las habilidades espaciales de las hembras son mayores (revisado en Pompili *et al.*, 2010).

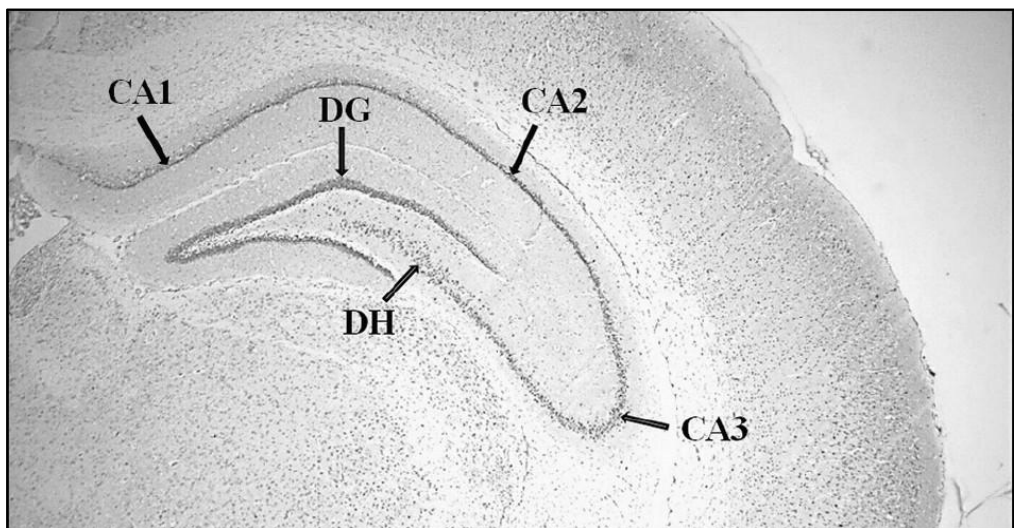


Figura 1.4 Fotomicrografía de las principales subdivisiones del hipocampo de los roedores. CA1, CA2, CA3, regiones 1, 2, 3 del *cornu ammonis*; DG, giro dentado; DH, hilus. Figura modificada de Pamidi & Nayak (2014).

Topillos

La diversidad en sistemas de apareamiento que presentan los topillos del género *Microtus* es ideal para estudiar la relación entre distintos comportamientos reproductivos y sus bases neurales (Jacobs *et al.*, 1990; Young & Wang, 2004). Las especies monógamas de topillos (e.g. *M. pinetorum*, *M. ochrogaster*) muestran un escaso dimorfismo sexual en el uso del espacio e hipocampos de tamaño similar en ambos sexos. Por otra parte, los machos de especies polígamas (e.g. *M. pennsylvanicus*) utilizan espacios domésticos mucho más grandes que los de las hembras y sus hipocampos son también más grandes. El dimorfismo sexual en el hipocampo de los topillos, por tanto, depende de la existencia de diferencias sexuales en el uso del espacio doméstico (Getz & Hofmann, 1986; Gaulin & FitzGerald, 1988; Jacobs *et al.*, 1990; Galea *et al.*, 1999; An *et al.*, 2006).

El espacio doméstico, el tamaño del hipocampo y las habilidades espaciales en los topillos polígamos (*M. pennsylvanicus*) varían además estacionalmente. Los machos de los topillos amplían su espacio doméstico durante la estación reproductiva (primavera-verano; Madison & McShea, 1987). Durante esta estación, los machos tienen hipocampos más grandes que las hembras y mayores habilidades espaciales (Yaskin, 1984; Jacobs *et al.*, 1990; Galea *et al.*, 1995, 1996, 1999). El fotoperiodo creciente de primavera estimula la secreción de testosterona en los machos, que a su vez, estimula el crecimiento y la neurogénesis del hipocampo (Yaskin, 1984; Dark *et al.*, 1990; Galea *et al.*, 1999; Galea & McEwen, 1999). La testosterona, y su metabolito el estradiol, promueven la supervivencia de las nuevas neuronas y el

reclutamiento neuronal en el giro dentado (Galea & McEwen, 1999; Ormerod & Galea, 2003; Ormerod *et al.*, 2004). Las hembras, en cambio, amplían su espacio doméstico fuera de la estación reproductiva, cuando los niveles de estradiol son bajos (otoño–invierno; Madison & McShea, 1987; Sheridan & Tamarin, 1988; Galea *et al.*, 1995, 1996; Galea & McEwen, 1999). Fuera de la estación reproductiva, el giro dentado de las hembras muestra tasas elevadas de proliferación celular y de reemplazo neuronal (Galea & McEwen, 1999). Con la llegada de la estación reproductiva, el incremento en los niveles circulantes de estradiol y corticosterona en las hembras disminuye la proliferación celular en la zona subgranular. Como resultado el giro dentado recluta menos neuronas (Galea & McEwen, 1999; Ormerod & Galea, 2001; Galea, 2008), lo que se asocia con la disminución en las habilidades espaciales de las hembras en la estación reproductiva (Galea *et al.*, 1995, 1996).

1.3.3 El sistema vomeronasal

El sistema vomeronasal es un circuito neural multisináptico que se inicia en el órgano vomeronasal, continúa a través de los bulbos olfativos accesorios y la amígdala, y finaliza en centros endocrinos, motivacionales y motores como el área préoptica, el hipotálamo o el tronco del encéfalo (Simerly, 2002; Fig. 1.5).

Tradicionalmente el sistema vomeronasal se ha concebido como un sistema especializado en la detección y el análisis de feromonas, que son estímulos químicos que emitidos por un individuo estimulan comportamien-

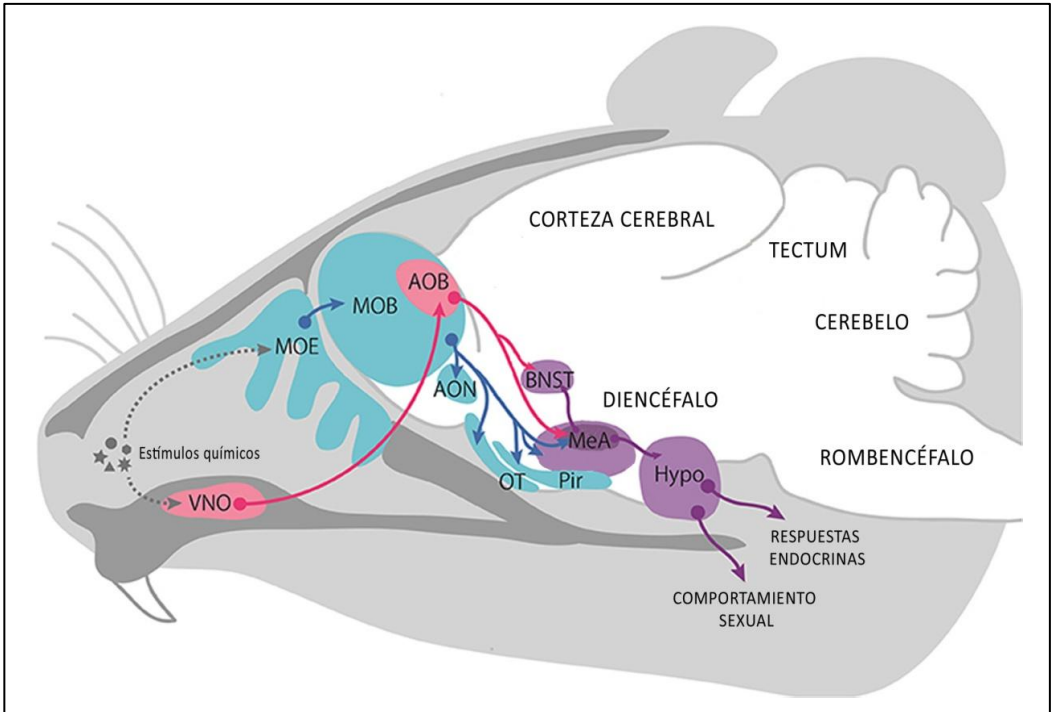


Figura 1.5 Diagrama esquemático de los núcleos cerebrales que componen los sistemas olfativo y vomeronasal de los roedores. Las vías olfativa y vomeronasal transcurren por separado desde los órganos sensoriales (el epitelio olfativo principal y el órgano vomeronasal respectivamente) hasta el hipotálamo, aunque confluyen en algunos núcleos cerebrales como la amígdala medial. AOB (bulbo olfativo principal), AON (núcleo olfativo anterior), BNST (bed nucleus de la estría terminal), Hypo (hipotálamo), MeA (amígdala medial), MOB (bulbo olfativo principal), MOE (epitelio olfativo principal), OT (tubérculo olfativo), córtex piriforme (Pir), VNO (órgano vomeronasal). Figura modificada a partir de Asaba *et al.* (2014).

tos y/o respuestas endocrinas en conespecíficos (Powers & Winans, 1975; Keverne, 2004; Wyatt, 2014). Sin embargo, muchos estudios han demostrado que el sistema vomeronasal responde también a estímulos químicos en otros contextos (por ejemplo, la detección de depredadores o de presas), y muchas feromonas son detectadas por el sistema olfativo principal y no por el sistema vomeronasal (Burghardt, 1970; Wyatt, 2014). Gran parte de la variabilidad descrita en el sistema vomeronasal se asocia al sexo. Dimorfismos sexuales en el tamaño, la conectividad, la composición celular, la morfología de las neuronas, la expresión de neuropéptidos, la respuesta a esteroides sexuales y adrenales, o la respuesta a neurotransmisores son comunes en el sistema vomeronasal (revisado en Segovia & Guillamón, 1993; Cooke *et al.*, 1998). Junto al dimorfismo sexual, se ha descrito también variación estacional en el sistema vomeronasal (e.g. en salamandras pletodóntidas, Dawley & Crowder, 1995). A continuación exponemos los modelos más estudiados de variación sexual y estacional en el tamaño, el número de neuronas o la neurogénesis adulta en el sistema vomeronasal.

El órgano vomeronasal en las salamandras pletodóntidas

Los pletodóntidos (Fam. Plethodontidae) son unas pequeñas salamandras terrestres que habitan en bosques húmedos. *Plethodon cinereus*, el pletodóntido más estudiado, se reproduce desde octubre a mayo, y durante el verano defiende territorios alrededor de pequeños espacios húmedos (Mathis, 1990, 1991; Jaeger *et al.*, 2000). *P. cinereus* utiliza la quimiorrecepción y la comunicación química en las interacciones sociales y la

defensa del territorio (Arnold, 1977; Jaeger *et al.*, 1986). Deposita marcas olorosas en el sustrato y en los pellets fecales que proporcionan información sobre el sexo (Martin *et al.*, 2005), la familiaridad (Gillette *et al.*, 2000), el parentesco (Forester & Anders, 2000), y la calidad de la dieta del emisor (Karuzas *et al.*, 2004). Además detecta marcas olorosas mediante el comportamiento quimiorreceptor de *nose-tapping*, que consiste en golpear el sustrato, los pellets fecales u otros individuos con el hocico (Dawley & Bass, 1989). Mediante este comportamiento, *P. cinereus* conduce las marcas olorosas desde el medio externo al órgano vomeronasal (Dawley & Bass, 1989).

Los pletodóntidos tienen grandes órganos vomeronasales en comparación con otras familias de salamandras, lo que destaca la importancia del sistema vomeronasal en estas salamandras (Dawley, 1998). En *P. cinereus* y *P. shermani*, el órgano vomerosal es más grande y tiene más células receptoras en los machos que en las hembras (Dawley, 1992a,b, 1998; Dawley & Crowder, 1995; Woodley, 2007). En *P. cinereus* además el órgano vomeronasal crece durante el verano (Dawley & Crowder, 1995). El crecimiento estacional se produce por una mayor adición de neuronas (receptores sensoriales) al epitelio vomerolfativo al final de la primavera que sobreviven hasta el otoño (Dawley *et al.*, 2000, 2006). Los esteroides sexuales no intervienen en el crecimiento estival del órgano vomeronasal en los pletodóntidos (Dawley & Crowder, 1995; Schubert *et al.*, 2006; Woodley *et al.*, 2007). El dimorfismo sexual en el órgano vomeronasal se ha asociado con diferencias sexuales en el comportamiento quimiorreceptor (Dawley, 1992a,b,

1998; Dawley & Crowder, 1995; Woodley, 2007), mientras que el crecimiento estival podría estar relacionado con el incremento en la exploración quimiosensorial y la estimulación vomeronasal durante el forrajeo y la defensa del territorio que tienen lugar en el verano (Dawley *et al.* 2000, 2006).

Se desconoce si la neurogénesis adulta en los bulbos olfativos de *P. cinereus* fluctúa con la estación como en el órgano vomeronasal. Sin embargo, sí hay evidencia de que la proliferación celular en la zona periventricular, de donde proceden las nuevas neuronas destinadas a los bulbos olfativos en los anfibios, varía estacionalmente. La proliferación celular en la zona periventricular de *P. cinereus* es mayor al final de la primavera que el resto del año, coincidiendo con el pico de neurogénesis en el órgano vomeronasal (Dawley *et al.*, 2000).

El sistema vomeronasal en los roedores

Los roedores utilizan sus sentidos químicos en numerosos contextos como la búsqueda de alimento, la detección de depredadores o en interacciones sociales (Vander Wall *et al.*, 2003; Brennan & Kendrick, 2006; Ferrero *et al.*, 2011). Roedores machos y hembras a menudo exhiben distintos comportamientos quimiorreceptores o diferentes respuestas a estímulos químicos (principalmente hacia olores de conespecíficos; Halem *et al.*, 1999; Touhara & Voshall, 2009). Por ejemplo, las ratas machos invierten más tiempo en la exploración quimiosensorial que las hembras (Peña *et al.*, 2006), los ratones machos discriminan mejor entre olores de conespecíficos que las

hembras (Wesson *et al.*, 2006), y los ratones hembra muestran una mayor sensibilidad a los olores que los machos (Baum & Keverne, 2002; Pierman *et al.*, 2006). Dado que la quimiorrecepción y la respuesta a los olores de conespecíficos en los roedores difiere entre los sexos, cabría esperar que el sistema vomeronasal en los roedores fuera también sexualmente dimórfico (Simerly, 2002).

Ratas

El sistema vomeronasal de las ratas (*Rattus norvegicus*) es sexualmente dimórfico en toda su extensión. La mayoría de dimorfismos sexuales descritos favorecen a los machos. Por ejemplo, el órgano vomeronasal, el bulbo olfativo accesorio y el núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica (SDN-POA) son más grandes y tienen más neuronas en los machos que en las hembras (revisado en Segovia & Guillamón, 1993; Cooke *et al.*, 1998). Sólo algunas regiones como el núcleo periventricular anteroventral (AVPV) son más grandes y tienen más neuronas en las hembras (Segovia & Guillamón, 1993; Cooke *et al.*, 1998). Los machos tienen cuerpos más grandes que las hembras y posiblemente algunas estructuras del sistema vomeronasal son más grandes en los machos por este motivo (e.g. el órgano vomeronasal; Segovia & Guillamón, 1982; Weiler & Farbman, 1997; Weiler *et al.* 1999). Otras estructuras, sin embargo, difieren demasiado entre los sexos para que el dimorfismo sexual se deba únicamente a un efecto de escala (e.g. el SDN-POA; Shapiro *et al.*, 1991).

La diferenciación sexual del sistema vomeronasal de las ratas tiene lugar durante el desarrollo perinatal y depende del efecto organizador de los andrógenos. En las áreas cerebrales del sistema vomeronasal que son más grandes en los machos adultos (e.g. el SDN-POA), los andrógenos, aromatizados en estrógenos, estimulan la supervivencia de las nuevas neuronas. En cambio, en las áreas que son más grandes en las hembras adultas (e.g. el AVPV), los andrógenos favorecen la muerte celular (Segovia & Guillamón, 1993; Simerly, 2002). Algunos investigadores (e.g. Segovia & Guillamón, 1993; De Vries & Villalba, 1997) han sugerido que la diferenciación sexual durante el desarrollo perinatal organiza el sistema vomeronasal para favorecer en los machos adultos la exhibición de comportamientos “masculinos” como la monta o la agresividad en los combates, e inhibir la exhibición de comportamientos “femeninos” como la lordosis y la lactancia. En los machos, las áreas cerebrales implicadas en la regulación de los comportamientos típicamente masculinos, como el SDN-POA, crecerían durante el desarrollo perinatal; por el contrario, las áreas cerebrales implicadas en la regulación de comportamientos típicamente femeninos se atrofiarían (Segovia & Guillamón, 1993). Estas interpretaciones parten de la creencia de que el sistema vomeronasal está especializado en la detección de feromonas, y no tienen en cuenta la implicación del sistema vomeronasal en otros muchos contextos (Baxi *et al.*, 2006).

Los esteroides sexuales regulan también procesos celulares en el sistema vomeronasal de las ratas adultas, como por ejemplo, la neurogénesis en el bulbo olfativo accesorio (AOB). La neurogénesis adulta es sexualmente

dimórfica en las ratas: los machos incorporan más neuronas al AOB que las hembras (Peretto *et al.*, 2001). Esto es debido en parte a que el aumento en los niveles de estrógenos durante la fase de proestro reduce la supervivencia de las nuevas neuronas en el AOB de las hembras, favoreciendo el reemplazamiento neuronal (Tanapat *et al.*, 1999; Brännvall *et al.*, 2002; Hoyk *et al.*, 2006). La intensificación del reemplazamiento neuronal en el AOB se ha relacionado con la exhibición de mayores capacidades quimiosensoriales de las hembras adultas en la fase de proestro (e.g. mayor sensibilidad a los olores; Pietras & Moulton, 1974).

Topillos

El comportamiento reproductivo de los topillos es más sexualmente dimórfico en especies polígamas que en especies monógamas, lo que se asocia con la presencia de mayores dimorfismos sexuales en el sistema vomeronasal (De Vries & Villalba, 1997). Por ejemplo, el órgano vomeronasal es más grande en topillos polígamos hembras que en los machos, pero similar entre sexos en topillos monógamos (Maico *et al.*, 2001, 2003). El bulbo olfativo accesorio, la amígdala medial y el SDN-POA también son sexualmente dimórficos en topillos polígamos (más grandes en los machos), pero similar entre sexos en topillos monógamos (Shapiro *et al.*, 1991; Tai *et al.*, 2004; An *et al.*, 2006). Los esteroides sexuales participan en la diferenciación sexual del sistema vomeronasal durante el desarrollo perinatal (e.g. Lansing & Lonstein, 2006) y regulan la plasticidad del sistema vomeronasal en los topillos adultos. En los topillos machos, la testosterona, transformada en estradiol, estimula la

proliferación celular y la producción de neuronas en la amígdala durante la primavera (Galea & McEwen, 1999; Fowler *et al.*, 2003). En las hembras, la neurogénesis adulta varía con el ciclo estral. Los niveles altos de estradiol en la fase de proestro incrementan la producción de neuronas en el SVZ y el RMS, lo que incrementa la incorporación de neuronas en el bulbo olfativo accesorio (Smith *et al.*, 2001). El dimorfismo sexual en el sistema vomeronasal de los topillos polígamos se ha relacionado con distintos comportamientos sexualmente dimórficos, como los cuidados parentales. Se ha sugerido que la posesión de órganos vomeronasales más grandes en topillos hembra respecto a los machos les permitiría detectar más fácilmente a los machos y así proteger de forma más eficiente a sus crías (Maico *et al.*, 2003).

1.3.4 Síntesis

Comparando los modelos más estudiados en relación al dimorfismo sexual y la estacionalidad en el tamaño del cerebro y la neurogénesis adulta, observamos unos patrones generales. Por ejemplo, el sexo que depende en mayor medida de unas determinadas modalidades sensoriales o capacidades cognitivas, o exhibe determinados comportamientos sensoriales, motores o cognitivos con una mayor frecuencia e intensidad, tiene áreas sensoriales, motoras y de asociación más grandes y que incorporan más neuronas en el adulto (Tablas 1.2 y 1.4). Estas áreas crecen e incorporan más neuronas principalmente durante la estación reproductiva, ya que en esta estación aumenta la dependencia de estas modalidades sensoriales y capacidades cognitivas (Tabla 1.3 y 1.5). Los esteroides sexuales organizan las áreas

cerebrales principalmente durante el estado embrionario y perinatal, pero a menudo también modifican la estructura de estas áreas en los adultos. Hormonas esteroides como la testosterona, transformada en estradiol, estimulan el crecimiento y la neurogénesis de las áreas cerebrales. Por regla general, la testosterona y el estradiol favorecen la supervivencia de las nuevas neuronas generadas por neurogénesis adulta, aunque su efecto depende de sus niveles y del tiempo de exposición (Tabla 1.6). También en algunos animales estas hormonas estimulan la proliferación celular en la zona ventricular (Tabla 1.6). El incremento en los niveles de esteroides sexuales en la estación reproductiva (principalmente en primavera), por tanto, contribuyen a la acumulación de nuevas neuronas y al consiguiente crecimiento del área cerebral a la que se incorporan (Tabla 1.3, 1.5 y 1.6). Finalizada la estación reproductiva, el incremento en los niveles de corticosterona actúa como antagonista de la testosterona, favoreciendo la regresión de las áreas cerebrales y el descenso de los niveles de neurogénesis adulta (Tabla 1.6).

Tabla 1.2 Dimorfismo sexual en el tamaño del cerebro

Áreas cerebrales	Grupo zoológico	Dimorf.	Comportamiento sexualmt. dimórfico	Referencias
núcleos del canto (HVC, RA, Área X)	aves canoras (<i>Serinus canaria</i> , <i>Taeniopygia guttata</i>)	♂ > ♀	canto más frecuente, complejo y este-reotipado en machos que en hembras	Nottebohm & Arnold, 1976
hipocampo (aves)	aves parásitas (<i>Molothrus ater</i> , <i>M. bonariensis</i>)	♀ > ♂	parasitismo de nidos presente en hembras, ausente en los machos	Sherry <i>et al.</i> , 1993; Reboreda <i>et al.</i> , 1996
hipocampo (mamíferos)	ardillas grises (<i>Sciurus carolinensis</i>) topillos (<i>Microtus pennsylvanicus</i>) gerbos (<i>Meriones unguiculatus</i>); ratas (<i>Rattus norvegicus</i>); ratas canguro (<i>Dipodomys merriami</i> , <i>D. spectabilis</i>)	♂ > ♀	espacios domésticos más grandes en los machos que en las hembras; los machos muestran un mejor aprendizaje espacial que las hembras	Jacobs <i>et al.</i> , 1990; Jacobs & Spencer, 1994; Madeira & Liebermann, 1995; Sherry <i>et al.</i> , 1996; Lavenex <i>et al.</i> , 2000a
palio dorsolateral	peces blénidos (<i>Lipophrys pholis</i> , <i>Parablennius parvicornis</i>)	♀ > ♂	espacios domésticos más grandes en las hembras que en los machos	Costa <i>et al.</i> , 2011
VNO (anfibios)	salamandras pletodóntidas (<i>Plethodon cinereus</i> , <i>P. shermani</i>)	♂ > ♀	diferencias sexuales en la quimiorrecepción	Dawley, 1992b; Woodley, 2007
amígdala – área preóptica (anfibs)	sapos (<i>Bufo japonicus</i>)	♂ > ♀	canto más frecuente en los machos que en las hembras	Takami & Urano, 1984
VNO (mamíferos)	topillos polígamos (<i>Microtus pennsylvanicus</i>)	♀ > ♂	agresividad en las hembras y protección de las crías en la madriguera	Maico <i>et al.</i> , 2003
VNO, AOB (mamíferos)	ratas (<i>Rattus norvegicus</i>) topillos polígamos (<i>Microtus fortis</i>)	♂ > ♀	diferencias sexuales en la quimiorrecepción; ausencia de cuidados parentales en los machos	Segovia & Guillamón, 1982; Segovia <i>et al.</i> , 1984; Tai <i>et al.</i> , 2004; An <i>et al.</i> , 2006
SDN-POA (mamíferos)	ratas (<i>R. norvegicus</i>); topillos polígamos (<i>M. montanus</i>) ratones (<i>Mus musculus</i>)	♂ > ♀	cortejo y cópula en los machos; ausencia de cuidados parentales en los machos	Gorski <i>et al.</i> , 1980; Shapiro <i>et al.</i> , 1991; Orikasa & Sakuma, 2010
AVPV (mamíferos)	ratas (<i>R. norvegicus</i>) topillos polígamos (<i>M. montanus</i>)	♀ > ♂	regulación de secreción de gonadotropinas por hormonas ováricas	Bleier <i>et al.</i> , 1982 Shapiro <i>et al.</i> , 1991

Tabla 1.3 Estacionalidad en el tamaño del cerebro

Áreas cerebrales	Grupo zoológico	Estacionalidad	Comportamiento estacional	Referencias
núcleos del canto (HVC, RA, Área X)	aves canoras (<i>Serinus canaria</i> , <i>Pipilo maculatus</i> , <i>Melospiza melodia</i> , <i>Junco hyemalis</i> , <i>Zonotrichia leucophrys</i>)	crecen en primavera	canto más frecuente, complejo y este-reotipado en estación reproductiva (primavera) que en el resto del año	Nottebohm, 1981; Smith <i>et al.</i> 1997a-c; Gulledge & Deviche 1997; Brenowitz <i>et al.</i> , 1998
hipocampo (aves)	aves parásitas (<i>Molothrus bonariensis</i> , <i>M. rufoaxillaris</i>)	crece en primavera	activación del parasitismo de nidos en estación reproductiva (primavera)	Clayton <i>et al.</i> , 1997
	aves que almacenan alimento (<i>Poecile atricapillus</i>)	crece en otoño / invierno	almacenamiento y recuperación del alimento en otoño e invierno	Smulders <i>et al.</i> , 1995 Hoshooley & Sherry, 2007
hipocampo (mamíferos)	musarañas (<i>Sorex araneus</i> y <i>S. minutus</i>)	se atrofia en invierno, crece en primavera	nacimiento en primavera, inactividad en invierno, reproducción en segunda primavera	Dehnel, 1949 Pucek, 1965 Yaskin, 1994
	ardillas grises (<i>Sciurus carolinensis</i>)	sin cambios estacionales	almacenamiento de alimento en otoño, reproducción en primavera	Lavenex <i>et al.</i> , 2000a
	topillos polígamos (<i>Microtus pennsylvanicus</i>)	crece en primavera-verano en ambos sexos	ampliación de espacio doméstico: ♂ en estación reproductiva (primavera-verano); ♀ en estación no reproductiva	Yaskin, 1984 Galea & McEwen, 1999 Galea <i>et al.</i> , 1999
	ratones (<i>Peromyscus maniculatus</i>)	crece en primavera	ampliación de espacio doméstico en los machos en estación reproductiva	Perrot-Sinal <i>et al.</i> , 1998; Pyter <i>et al.</i> , 2005, 2006
n. marcapasos, n. premarcapasos, ELL	peces eléctricos (<i>Brachyhypopomus</i>)	crecen en primavera	emisión de señales eléctricas en el cortejo en la estación reproductiva	Dunlap <i>et al.</i> , 2011 Quintana <i>et al.</i> , 2011a,b
VNO (anfibios)	salamandras pletodóntidas (<i>Plethodon cinereus</i>)	crece en verano en ambos sexos	más exploración quimiosensorial en verano	Dawley & Crowder, 1995 Dawley <i>et al.</i> , 2000, 2006
amígdala – área preóptica (anfibs.)	sapos (<i>Bufo japonicus</i>)	crece en primavera	canto y reproducción en estación reproductiva (primavera)	Takami & Urano, 1984
bulbos olfativos (mamíferos)	musarañas (<i>Sorex araneus</i> y <i>S. minutus</i>)	sin cambios estacionales	inactividad en invierno, reproducción en primavera	Dehnel, 1949; Pucek, 1965 Yaskin, 1994

Tabla 1.4 Dimorfismo sexual en la neurogénesis adulta (I)

Áreas cerebrales	Grupo zoológico	Dimorfismo	Comportam. sexualmt dimórfico	Referencias
núcleo del canto HVC (aves)	aves canoras (<i>Taeniopygia guttata</i> , <i>Serinus canaria</i> ,)	proliferación celular en VZ y/o supervivencia de las nuevas neuronas en los núcleos: $\text{♂} > \text{♀}$	canto más frecuente, complejo y estereotipado en machos que en hembras en época reproductiva	Nordeen & Nordeen, 1988; Rasika <i>et al.</i> , 1994; Katz <i>et al.</i> , 2008
hipocampo (mamíferos)	ardillas (<i>Sciurus carolinensis</i>)	no existen diferencias entre sexos en proliferación celular	espacios domésticos más grandes en machos que en hembras	Lavenex <i>et al.</i> , 2000b
	topillos polígamos (<i>Microtus pennsylvanicus</i>)	proliferación celular en z. subgranular y supervivencia de las nuevas neuronas en la capa granular: $\text{♀} > \text{♂}$ (en estación no reproductiva)	en la estación no reproductiva, el espacio doméstico se amplía en las hembras y se reduce en los machos	Galea & McEwen, 1999
	ratas (<i>Rattus norvegicus</i>)	proliferación celular en z. subgranular: $\text{♀} > \text{♂}$ (en fase de proestro) supervivencia de nuevas neuronas en capa granular: $\text{♂} > \text{♀}$	diferencias sexuales en aprendizaje espacial que favorecen a machos o hembras según el procedimiento experimental	Tanapat <i>et al.</i> , 1999 Galea, 2008
	ratones (<i>Mus musculus</i>)	no existen diferencias entre sexos en proliferación celular		Lagace <i>et al.</i> , 2007

Tabla 1.4 Dimorfismo sexual en la neurogénesis adulta (II)

Áreas cerebrales	Grupo zoológico	Dimorfismo	Comportam. sexualmt dimórfico	Referencias
bulbos olfativos (mamíferos)	ratas (<i>Rattus norvegicus</i>)	no diferencias en la proliferación celular en SVZ supervivencia de nuevas neuronas y/o reclutamiento neuronal en capa granular de bulbos olfativos: ♀ > ♂	diferencias sexuales en la quimiorrecepción; cortejo y cópula en los machos	Tanapat <i>et al.</i> , 1999 Peretto <i>et al.</i> , 2001 Brännvall <i>et al.</i> , 2002 Hoyk <i>et al.</i> , 2006
	ratones (<i>Mus musculus</i>)	reclutamiento neuronal en bulbos olfativos accesorios: ♂ > ♀	agresividad en hembras y protección de las crías en la madriguera	Nunez-Parra <i>et al.</i> , 2011
amígdala (mamíferos)	topillos (<i>Microtus ochrogaster</i>)	proliferación celular aumenta en ♀ pero no en ♂	respuesta a olores de conespecíficos del sexo opuesto	Liu <i>et al.</i> , 2014
hipotálamo (peces teleósteos)	doradas (<i>Sparus aurata</i>)	proliferación celular en z. ventricular del hipotálamo dorsal: ♀ > ♂	diferencias sexuales en la reproducción	Zikopoulos <i>et al.</i> , 2001
cerebelo (peces teleósteos)	peces cebra (<i>Danio rerio</i>)	proliferación celular en corpus cerebelli y reclutamiento de neuronas en la capa granular de la válvula cerebelli: ♂ > ♀	diferencias sexuales en la locomoción	Ampatzis & Dermon, 2007

Tabla 1.5 Estacionalidad en la neurogénesis adulta (I)

Áreas cerebrales	Grupo zoológico	Estacionalidad	Comportamiento estacional	Referencias
núcleo del canto HVC	aves canoras (<i>Serinus canaria</i> , <i>Melospiza melodia</i>)	mayor supervivencia de las nuevas neuronas durante la estación reproductiva	canto más frecuente, complejo y estereotipado en estación reproductiva (primavera)	Kirn <i>et al.</i> , 1994; Tramontin & Brenowitz, 1999
hipocampo (aves)	aves que almacenan alimento (<i>Poecile atricapillus</i>)	mayor reclutamiento de neuronas en otoño / invierno	almacenamiento y recuperación del alimento en otoño e invierno	Barnea & Nottebohm, 1994; Hoshooley & Sherry, 2007
hipocampo (mamíferos)	musarañas (<i>Sorex araneus</i> y <i>S. minutus</i>)	intensa neurogénesis en la 1ª primavera, cae en invierno y cesa en la 2ª primavera	nacimiento en primavera, inactividad en invierno, reproducción en segunda primavera	Bartkowska <i>et al.</i> , 2008
	ardillas grises (<i>Sciurus carolinensis</i>)	sin cambios estacionales	almacenan alimento en otoño, reproducción en primavera	Lavenex <i>et al.</i> , 2000b
	topillos (<i>M. pennsylvanicus</i>)	♂: mayor supervivencia de nuevas neuronas en primavera ♀: mayor proliferación celular en otoño	ampliación de espacio doméstico: ♂ en estación reproductiva (primavera-verano) ♀: en estación no reproductiva en otoño	Galea & McEwen, 1999; Ormerod & Galea, 2001, 2003; Ormerod <i>et al.</i> , 2004; Galea <i>et al.</i> , 2008
	hámsters dorados (<i>Mesocricetus auratus</i>)	la neurogénesis aumenta en otoño	almacenamiento de alimento en otoño	Huang <i>et al.</i> , 1998

Tabla 1.5 Estacionalidad en la neurogénesis adulta (II)

Áreas cerebrales	Grupo zoológico	Estacionalidad	Comportamiento estacional	Referencias
epitelio olfativo (peces teleóstos)	carpas (<i>Carassius carassius</i>)	más células criptales en la superficie epitelial en verano	sensibilidad olfativa a las feromonas sexuales	Hamdani <i>et al.</i> , 2008
órg. vomeronasal y zona periventricular (anfibios)	salamandras pletodóntidas (<i>Plethodon cinereus</i>)	mayor adición de neuronas a VNO y zona periventricular al final de la primavera	más exploración quimiosensorial en verano relacionada con más forrajeo y/o territorialidad	Dawley <i>et al.</i> , 2000, 2006
área preóptica (anfibios)	ranas (<i>Rana temporaria</i>)	neurogénesis aumenta al final de primavera y cae en otoño	cortejo y apareamiento en verano	Chetverukhin & Polenov, 1993
	ranas (<i>Pelophylax esculentus</i>)	más neurogénesis en otoño que al final de primavera	cortejo y apareamiento en verano	Minelli <i>et al.</i> , 1982
SVZ (mamíferos)	musarañas (<i>Sorex araneus</i> y <i>S. minutus</i>)	intensa neurogénesis en 1ª y 2ª primavera, cae en invierno	nacimiento en primavera, inactividad en invierno, reproducción en segunda primavera	Bartkowska <i>et al.</i> , 2008
amígdala (mamíferos)	topillos machos (<i>M. pennsylvanicus</i>)	mayor supervivencia de nuevas neuronas en primavera	amplían espacio doméstico en estación reproductiva (primavera-verano)	Galea & McEwen, 1999; Fowler <i>et al.</i> , 2003
núcleo marcapasos, n. premarcapasos, lóbulo electrosensorial de la línea lateral	peces eléctricos (<i>Brachyhypopomus gauderio</i>)	aumenta proliferación celular en estación reproductiva	emisión de señales eléctricas en cortejo en estación reproductiva	Dunlap <i>et al.</i> , 2011; Quintana <i>et al.</i> , 2011a,b

Tabla 1.6 Hormonas esteroides y neurogénesis adulta (I)

Áreas cerebrales	Grupo zoológico	Hormonas esteroides	Efecto sobre neurogénesis adulta	Efecto sobre comportamiento	Referencias
núcleos del canto (HVC, RA, Área X)	aves canoras (<i>Serinus canaria</i> , <i>Melospiza melodia</i> , <i>Sturnus vulgaris</i>)	testosterona, estradiol, 5αDHT en machos	HVC: aumentan supervivencia de nuevas neuronas RA: aumentan tamaño de somas y arborización dendrítica	activación del canto, más complejo y estereotipado en primavera	DeVoogd & Nottebohm, 1981; Rasika <i>et al.</i> , 1994; Hidalgo <i>et al.</i> , 1995; Smith <i>et al.</i> , 1997c; Absil <i>et al.</i> , 2003
	aves canoras (<i>Melospiza melodia</i> , <i>Taeniopygia guttata</i>)	corticosterona	HVC: disminuye proliferación celular y/o supervivencia de nuevas neuronas	inhibición del canto en respuesta a un intruso	Wingfield & Silverin, 1986; Katz <i>et al.</i> , 2008; Newman <i>et al.</i> , 2010
hipocampo	aves que almacenan alimento (<i>Poecile gambeli</i>)	corticosterona en machos y hembras	no afecta a la proliferación celular en la zona ventricular ni a la anatomía del hipocampo	estimula la memoria espacial	Pradosudov, 2003 Pravosudov & Omanska, 2005
	topillos polígamos (<i>Microtus pennsylvanicus</i>)	testosterona y estradiol en machos	no afectan a la prolif. celular; estimulan la supervivencia de nuevas neuronas en capa granular	la testosterona, transformada en estradiol, estimula la memoria espacial	Galea <i>et al.</i> , 1995; Galea & McEwen, 1999; Ormerod & Galea, 2003; Ormerod <i>et al.</i> , 2004
		estradiol en hembras	a corto plazo estimula prolif. celular en z. subgranular; a largo plazo la inhibe; no afecta o reduce supervivencia de nuevas neuronas en c. granular	reduce las habilidades espaciales en las hembras	Galea <i>et al.</i> , 1995; Galea & McEwen, 1999; Ormerod & Galea, 2001; Galea, 2008
		corticosterona en hembras	reduce proliferación celular en z. subgranular	se desconoce cómo afecta	Galea & McEwen, 1999
	ratas (<i>Rattus norvegicus</i>)	testosterona y DHT en machos	no afectan a la prolif. celular; estimulan supervivencia de nuevas neuronas en capa granular	la testosterona estimula las habilidades espaciales transformada en estradiol	Spritzer & Galea, 2007 Barker & Galea, 2008; Galea, 2008; Spritzer <i>et al.</i> , 2011

Tabla 1.6 Hormonas esteroides y neurogénesis adulta (II)

Áreas cerebrales	Grupo zoológico	Hormonas esteroides	Efecto sobre neurogénesis adulta	Efecto sobre comportamiento	Referencias
hipocampo	ratas (<i>Rattus norvegicus</i>)	estradiol en machos	no afecta a la neurogénesis adulta	estimula habilidades espaciales en los machos	Spritzer & Galea, 2007 Barker & Galea, 2008 Spritzer <i>et al.</i> , 2011
		estradiol en hembras	a corto plazo estimula prolif. celular en z. subgranular; a largo plazo la inhibe; no afecta o reduce supervivencia de nuevas neuronas en c. granular	varios estudios discrepan en si el estradiol estimula o reduce las habilidades espaciales	Tanapat <i>et al.</i> , 1999, 2005 Ormerod <i>et al.</i> , 2003 Jonasson, 2005 Barker & Galea, 2008 Pompili <i>et al.</i> , 2010
		corticosterona en machos y hembras	suprime la proliferación celular reduce la supervivencia de la nuevas neuronas en giro dentado	reduce las habilidades espaciales	Bodnoff <i>et al.</i> , 1995 Tanapat <i>et al.</i> , 2001 Brummelte & Galea, 2010 Schoenfeld & Gould, 2012
	ratones (<i>Mus musculus</i>)	estradiol en hembras	no afecta a la neurogénesis adulta	estimula la memoria espacial	Li <i>et al.</i> , 2004 Lagace <i>et al.</i> , 2007
bulbos olfativos	ratas (<i>Rattus norvegicus</i>)	estradiol en hembras en fase de proestro	no influye sobre la proliferación celular en el SVZ reduce la supervivencia de las nuevas neuronas incorporadas a los bulbos olfativos	aumenta la sensibilidad en la detección de olores en la fase de proestro	Pietras & Moulton, 1974 Tanapat <i>et al.</i> , 1999 Peretto <i>et al.</i> , 2001 Brännwall <i>et al.</i> , 2002 Hoyk <i>et al.</i> , 2006
	ratones (<i>Mus musculus</i>)	estradiol en hembras en fase de proestro	disminuye proliferación celular en la SVZ y el reclutamiento de nuevas neuronas en los bulbos olfativos	aumenta la sensibilidad en la detección de olores en la fase de proestro	Schmidt & Schmidt, 1980 Sorwell <i>et al.</i> , 2008 Brock <i>et al.</i> , 2010

**La neurogénesis adulta en la
lagartija parda (*Podarcis liolepis*).
Objetivos de la tesis.**

cap. 2

2.1 La neurogénesis adulta en los reptiles

Las primeras evidencias de neurogénesis adulta en reptiles se remontan a las décadas de 1950 y 1960. En estos años, investigadores como Källen (1951), Fleischhauer (1957), Kirsche (1967), y Schulz (1969) describieron “áreas matriciales” especializadas con células indiferenciadas en el epéndimo que rodea las paredes ventriculares. Estas áreas, habitualmente localizadas en o cerca de los sulci ventriculares, se consideraron vestigios del tejido germinativo embrionario que retenía su potencial proliferativo en el adulto. En concordancia con esta idea, se describieron figuras mitóticas en el epéndima sulcal de individuos adultos de dos lacértidos, *Lacerta agilis* (Schulz, 1969) y *Podarcis sicula* (Hetzl, 1974). Sin embargo, en estos estudios, no quedaba claro si la proliferación en el epéndima conducía a la producción de neuronas o glía. Entre las décadas de 1970 y 1980, diversos estudios confirmaron la existencia de neurogénesis adulta en los reptiles. Estudios morfométricos revelaron un crecimiento continuo del cerebro en los reptiles más allá de los estadios de desarrollo pre- y perinatal (Platel, 1974), relacionados con un incremento postnatal en el número de neuronas (López-García *et al.*, 1984). Se describieron mitosis en el epéndima sulcal y células inmaduras asociadas a tallos de glía radial en el córtex de lagartos, que por sus características ultraestructurales, se identificaron como neuroblastos en migración (García-Verdugo *et al.*, 1986; Yanes-Méndez *et al.*, 1988). Se observaron zonas corticales neurogénicas en embriones de tortugas y lagartos aplicando autorradiografía de timidina tritiada (Caja 2.1; Goffinet *et al.*, 1986). Con esta misma técnica se identificaron células marcadas con timidina tritiada

y características ultraestructurales de neuronas, como la presencia de dendritas y sinapsis, en el córtex medial de los lagartos adultos (López-García *et al.*, 1988).

Actualmente la neurogénesis adulta en los reptiles se considera una de las más abundantes y extendidas en el cerebro de los vertebrados (Font *et al.*, 2001). Los reptiles adultos producen e incorporan neuronas principalmente en el telencéfalo, incluyendo los bulbos olfativos principales y accesorios, la región retrobulbar, las áreas corticales, el septum, la cresta ventricular dorsal, el núcleo esférico y el estriado. La neurogénesis adulta en los reptiles aprovecha los mismos mecanismos que la neurogénesis embrionaria (Fig. 2.1). Miles de nuevas células nacen en el epéndimo que rodea las paredes ventriculares, conocido como “zona ventricular” (VZ; López-García *et al.*, 1988, 1990b; García-Verdugo *et al.*, 2002). Desde la zona ventricular, las nuevas células migran a través del parénquima cerebral siguiendo los tallos de la glía radial, que a diferencia de lo que ocurre en los mamíferos, perdura más allá del desarrollo embrionario (Fig. 2.1c; Goffinet, 1983; García-Verdugo *et al.*, 1986; Yanes *et al.*, 1990; Font *et al.*, 1995). Durante la migración, las nuevas células inician su diferenciación en neuronas y se transforman en neuroblastos (Ramírez-Castillejo *et al.*, 2002; González-Granero *et al.*, 2006). En su lugar de destino, los neuroblastos finalizan su diferenciación: extienden su axón y se incorporan a los circuitos funcionales preexistentes (López-García *et al.*, 1990b). En la mayoría de las regiones neurogénicas, las nuevas células migran cortas distancias radiales hasta su destino final, habitualmente localizado en el parénquima adyacente a la zona ventricular. En las áreas con

estrato de somas bien definido, como el córtex o el núcleo esférico, este destino final suele ser dicho estrato celular (Fig. 2.1d).

En los bulbos olfativos, las neuronas no se producen *in situ*, sino que migran tangencialmente desde zonas proliferativas más caudales localizadas en la región retrobulbar (García-Verdugo *et al.*, 1989; Peñafiel *et al.*, 1996; Pérez-Cañellas *et al.*, 1997; Font *et al.*, 2001). La migración tangencial de neuroblastos a los bulbos olfativos en los reptiles es similar al torrente migratorio rostral (*rostral migratory stream*, RMS) de los mamíferos. En roedores y primates adultos, las neuronas de los bulbos olfativos proceden de poblaciones celulares que se originan en la zona subventricular de los ventrículos laterales (Luskin, 1993; Lois & Alvarez-Buylla, 1994; Bonfanti *et al.*, 1997; Kornack & Rakic, 2001) y migran tangencialmente hasta los bulbos olfativos a través del RMS. En el RMS, las nuevas células se imbrican en cadenas rodeadas de tubos formados por astrocitos. Durante su migración, estas células se diferencian progresivamente en neuronas hasta incorporarse en los bulbos olfativos (Lois *et al.*, 1996).

El fenotipo de las nuevas células generadas en el cerebro de los lagartos adultos ha sido determinado mediante autorradiografía de timidina tritiada combinada con microscopía electrónica o con inmunocitoquímica de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) combinada con marcadores fenotípicos específicos (Caja 2.1). Muchas de las células marcadas con timidina tritiada en la zona ventricular son inmunoreactivas a GFAP, un marcador de astrogliá, y tienen ultraestructura de glía radial (Font *et al.*, 1995). Estas células, que reciben el nombre de células B, son uniciliadas y se consideran las precursoras

de las neuronas que se generan por neurogénesis adulta en reptiles y aves (García-Verdugo *et al.*, 2002). Por otra parte, la mayoría de células marcadas con timidina tritiada o BrdU halladas fuera de la zona ventricular no son inmunoreactivas a GFAP (Yanes *et al.*, 1990). Estas células expresan durante su migración y de forma transitoria los marcadores específicos de neuroblastos doblecortina y PSA-NCAM. Son neuroblastos en migración, generados por división de las células B, y que reciben el nombre de células A (Ramírez-Castillejo *et al.*, 2002; González-Granero *et al.*, 2006). Una vez estos neuroblastos han alcanzado su destino final en el parénquima cerebral, adquieren características ultraestructurales de neuronas y se incorporan a circuitos funcionales. En los lagartos, por tanto, la mayoría de las células generadas en la región ventricular y que migran a sus lugares de destino en el parénquima cerebral son nuevas neuronas (López-García *et al.*, 1988; Pérez-Cañellas & García-Verdugo, 1996; Font *et al.*, 2001; García-Verdugo *et al.* 2002).

Caja 2.1 Marcadores de proliferación celular e identificación del fenotipo

de las células marcadas. Para distinguir las nuevas células de las preexistentes se utilizan marcadores de proliferación celular como la timidina tritiada o la 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU). Estas moléculas se incorporan al ADN durante la fase S del ciclo celular. La timidina tritiada es una molécula radiactiva que se revela con autorradiografía. La autorradiografía de la timidina tritiada marca la progenie de las células que se acaban de dividir y, variando los tiempos de supervivencia tras la inyección del marcador, permite reconstruir el momento y lugar de nacimiento de las nuevas células. El fenotipo de las células marcadas con timidina tritiada se puede identificar mediante la observación con microscopía electrónica y/o la combinación con inmunocitoquímica de marcadores de tipos celulares. El marcaje con BrdU se visualiza con técnicas inmunocitoquímicas y puede combinarse con inmunocitoquímica para marcadores específicos de glía (e.g. GFAP), neuronas inmaduras (e.g. PSA-NCAM, doblecortina) o neuronas maduras (e.g. NSE, NeuN), que permiten identificar el fenotipo de las células BrdU-positivas. La identificación se realiza con microscopía confocal, que garantiza la colocalización de la marca de BrdU con la de los marcadores fenotípicos en una misma célula (Kuhn *et al.*, 1996).

GFAP: glial fibrillary acidic protein; PSA-NCAM: polysialylated form of the neural cell adhesion molecule; NSE: neuron specific enolase; NeuN: neuron-specific nuclear protein.

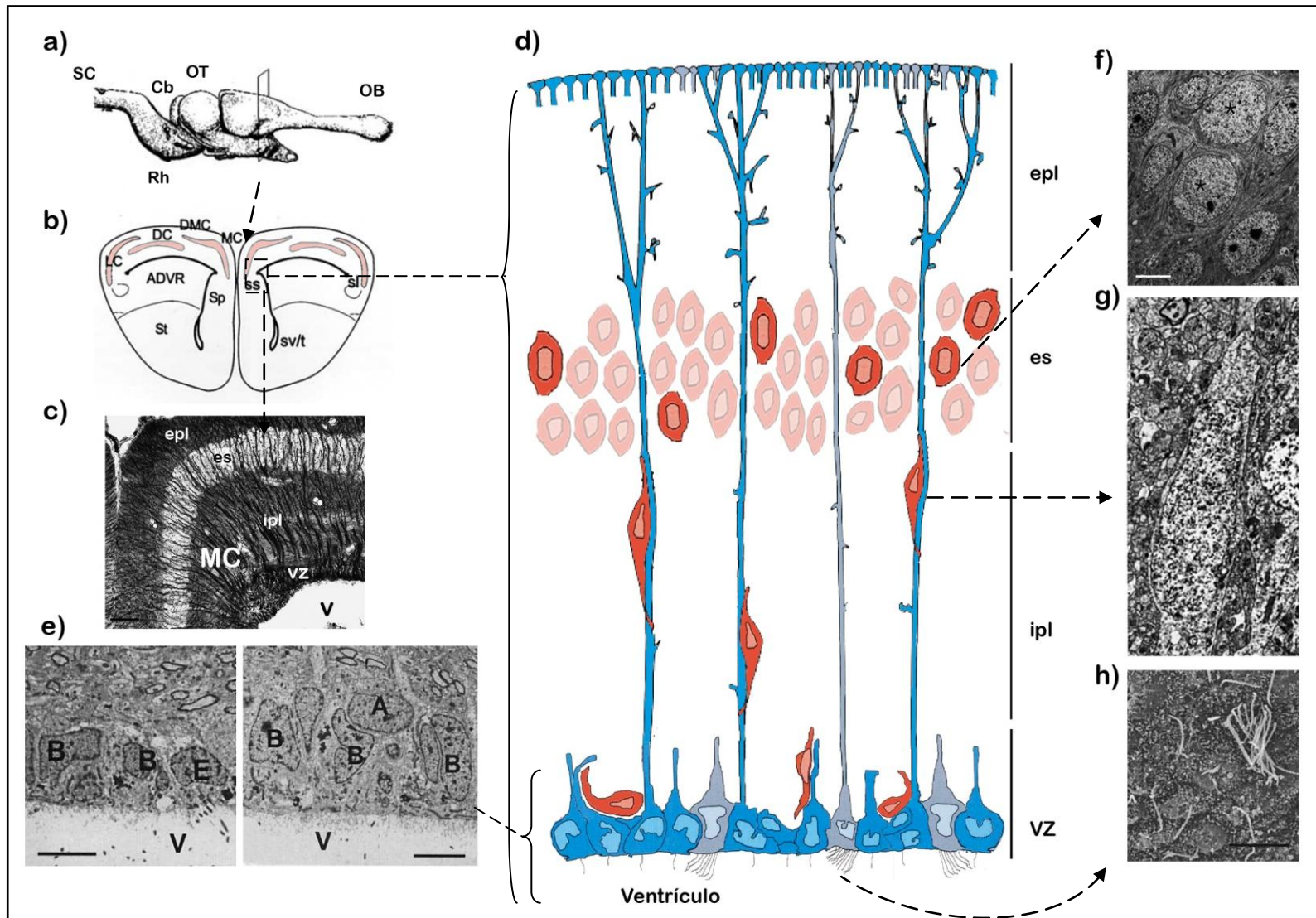


Figura 2.1 (página 58) Neurogénesis adulta en reptiles. a) Esquema mostrando las principales zonas del cerebro de *P. liolepis*. b) Dibujo realizado mediante cámara clara de una sección transversal del telencéfalo teñida con azul de toluidina. c) Fotomicrografía de la glía radial marcada con anti-GFAP en el córtex medial de un lagarto (barra de escala 50 μm). d) Estructura tetralaminar del córtex medial de *P. liolepis* y fases de la neurogénesis adulta. La zona ventricular consiste en un epitelio pseudoestratificado compuesto por tres tipos celulares: las células B (en azul) son células de glía radial uniciliadas; las células E (en gris) son células endimarias multiciliadas; y las células A (en rojo) son neuroblastos en migración que se originan a partir de las células B. En las áreas sulcales predominan las células B sobre las E. e) Fotomicrografía de la zona ventricular: células B, E y A (barra de escala 5 μm). f) Fotomicrografía del estrato de somas del córtex medial. Las nuevas neuronas, marcadas con asteriscos, son indistinguibles de las demás (barra de escala 5 μm). g) Fotomicrografía de un neuroblasto en migración siguiendo un tallo de glía radial. h) Fotomicrografía de barrido de una célula E multiciliada rodeada de células B uniciliadas en el sulcus ventricular (barra de escala 4 μm). Creado a partir de figuras de Font *et al.*, 2001 y García-Verdugo *et al.*, 2002.

ADVR, cresta dorsal ventricular anterior; Cb, cerebelo; DMC, córtex dorsomedial; DC, córtex dorsal; epl, capa plexiforme externa; es, estrato de somas; ipl, capa plexiforme interna; LC, córtex lateral; OB, bulbo olfativo; OT, techo óptico; Rh, rombencéfalo; SC, médula espinal; sl, sulcus lateralis; Sp, septum; ss, sulcus septomedialis; St, estriado; sv/t, sulcus ventralis/terminalis; VZ, zona ventricular; V, ventrículo.

2.2 Factores que regulan la neurogénesis adulta en los reptiles

A diferencia de aves y mamíferos, la información disponible en cuanto a la regulación de la neurogénesis adulta en otros vertebrados, como los reptiles, es escasa. Por ejemplo, la pérdida de tejido nervioso debido a lesiones físicas o químicas en el cerebro de los lagartos estimula la neurogénesis adulta. La intoxicación con 3-acetilpiridina en lagartos, que causa la muerte neuronal severa en áreas corticales, estimula la proliferación celular en la zona ventricular y la migración de nuevas neuronas que reemplazan a las neuronas dañadas, contribuyendo a la completa regeneración del córtex (Font *et al.*, 1991, 1995, 1997; López-García *et al.*, 1992; Desfilis *et al.*, 1993a; Molowny *et al.*, 1995). También la ablación quirúrgica de tejido cortical en los lagartos estimula la neurogénesis reactiva, aunque en estos casos la regeneración no es completa (Minelli *et al.*, 1978). Otros estudios han investigado los factores fisiológicos y ambientales que regulan la neurogénesis adulta en los reptiles. El mantenimiento en grandes recintos aumenta los niveles de neurogénesis en el córtex medial en los lagartos machos territoriales de la especie *Uta stansburiana* en comparación con los niveles que presentan lagartos mantenidos en recintos más pequeños (LaDage *et al.*, 2013). Los fotoperiodos cortos inhiben la proliferación celular en la zona ventricular, mientras que las temperaturas bajas ralentizan la migración de las nuevas células a sus lugares de destino en lagartos de las especies *Podarcis hispanica*, *Psammodromus algirus* y *Tropidurus hispidus* (Ramírez *et al.*, 1997; Peñafiel *et al.*, 2001; Marchioro *et al.*, 2012). Por último,

también se ha descrito estacionalidad en la proliferación celular de áreas telencéfalicas en lagartos y serpientes adultos (Delgado-González *et al.*, 2008, 2011; Maine *et al.*, 2014). Los estudios con lagartos tizones de Tenerife (*Gallotia galloti*) observan dos picos de proliferación celular a lo largo del año, aunque discrepan entre ellos en qué estaciones del año se producen (primavera y verano en Delgado-González *et al.*, 2008; primavera y otoño en Delgado-González *et al.*, 2011). En serpientes (*Thamnophis sirtalis*) se han descrito dos patrones estacionales en la neurogénesis adulta: 1) la proliferación celular en la zona ventricular es más alta en otoño que en primavera; 2) la migración de las nuevas células desde la zona ventricular al parénquima en el núcleo esférico y el complejo área preóptica / hipotálamo se acelera en otoño (Maine *et al.*, 2014).

2.3 Objetivos de la tesis

El objetivo principal de la tesis consiste en identificar factores que regulan el tamaño del cerebro y la neurogénesis adulta en los reptiles. Para ello estudiamos cómo el sexo, la estacionalidad y las hormonas esteroides afectan al tamaño del cerebro y de los bulbos olfativos, y a la proliferación celular en el telencéfalo de un lagarto, la lagartija parda (*Podarcis liolepis*; Boulenger, 1905; Squamata: Lacertidae; Fig. 2.2; Caja 2.2).

Podarcis liolepis es un pequeño lacértido diurno, cuya distribución se extiende a lo largo de las costas noroeste y este de la Península Ibérica, donde predomina el clima mediterráneo. Vive en rocas y muros próximos a

construcciones urbanas, donde se alimenta de pequeños artrópodos que captura mediante forrajeo activo (Desfilis *et al.*, 1993b). *P. liolepis* está activa durante todo el año, aunque su actividad disminuye considerablemente durante el invierno. Este lagarto se reproduce en la primavera, y realiza la puesta a principios de verano (Pérez-Mellado, 1997).

P. liolepis depende en gran medida de la quimiorrecepción para obtener información sensorial del entorno (Burghardt, 1970; Simon, 1983; Mason, 1992; Halpern, 1992; Schwenk, 1993, 1995; Cooper, 1996; Font, 1996). Utiliza sus sentidos químicos en la exploración del entorno, la detección de presas y depredadores, y en contextos sociales (Gómez *et al.*, 1993; Van Damme & Castilla, 1996; Cooper & Pérez-Mellado, 2002; Font & Desfilis, 2002; López & Martín, 2002, 2005; Desfilis *et al.*, 2003; Carazo *et al.*, 2007, 2008, 2011; Font *et al.*, 2012). La dependencia de la quimiorrecepción aumenta durante la estación reproductiva, ya que los lagartos utilizan los estímulos químicos para el reconocimiento de conoespecíficos y la discriminación del estatus social y sexual, e incluso para el reconocimiento individual (Font & Desfilis, 2002; Carazo *et al.*, 2007, 2008, 2011). Estos estímulos químicos son detectados principalmente por el sistema vomeronasal (Halpern, 1992). *P. liolepis* presenta comportamientos especializados en la quimiorrecepción como el bombeo gular, para la detección de partículas volátiles durante la olfacción, y el lengüetazo quimiosensorial, asociado con la detección de partículas no volátiles y la vomerolfacción. Con el lengüetazo quimiosensorial, la lengua captura las partículas no volátiles y las transfiere mediante un mecanismo en el que

posiblemente participe el suelo de la cavidad bucal al órgano vomeronasal, que posee un epitelio quimiosensorial. *P. liolepis*, como otros lacértidos, tiene los sistemas olfativos y vomerolfativos muy desarrollados, con bulbos olfativos muy grandes en comparación con otros lagartos de tamaño similar, por lo que se consideran entre los lagartos más quimiosensoriales que existen (Mason, 1992; Schwenk, 1993; Cooper, 1996; Font *et al.*, 2010).

P. liolepis es la especie de reptil en la que más se ha estudiado el fenómeno de la neurogénesis adulta (e.g. López-García *et al.*, 1988, 1990a,b; García-Verdugo *et al.*, 1989; Pérez-Sánchez *et al.*, 1989; Font *et al.*, 1997, 2001; Sampedro *et al.*, 2008). La neurogénesis adulta en *P. liolepis* se caracteriza por sus altos niveles en comparación con la de otros reptiles y porque está muy regionalizada en el telencéfalo: el córtex, los bulbos olfativos y el núcleo esférico producen y/o incorporan muchas más neuronas que otras áreas telencefálicas como el septum o el estriado (revisado en Font *et al.*, 2001). La abundante producción e incorporación de nuevas neuronas en las áreas quimiosensoriales en el telencéfalo de *P. liolepis* (i.e. en los bulbos olfativos principal y accesorio y sus zonas de proyección, el córtex lateral y el núcleo esférico) junto con la gran dependencia que tienen estos reptiles de la quimiorrecepción en múltiples contextos convierten a *P. liolepis* en un modelo ideal en los vertebrados para el estudio de la regulación de la neurogénesis adulta, de la relación entre la neurogénesis adulta y el comportamiento, o del valor adaptativo de la neurogénesis adulta en múltiples contextos (e.g. en la exploración del entorno, la detección de presas y depredadores, y en numerosos contextos sociales).



Figura 2.2 Ejemplar adulto de *Podarcis liolepis*

Caja 2.2 *Podarcis liolepis*, antes *P. hispanica*. La lagartija ibérica *Podarcis hispanica* / *hispanicus* (Steindachner, 1870) ha sido tradicionalmente entendida como una especie con una elevada variabilidad morfológica que se extendía por el sur de Francia, Península Ibérica y el norte de África (e.g. Pérez-Mellado & Galindo-Villardón, 1986). Estudios recientes de la secuencia del ADN mitocondrial, el polimorfismo genético-enzimático, la morfología corporal y la quimiorrecepción, han sugerido que la especie *P. hispanica* es en realidad un complejo parafilético compuesto por varios linajes distinguibles en genética, morfología y comportamiento (Harris & Sá-Sousa, 2002; Barbosa *et al.*, 2005, 2006; Pinho *et al.*, 2006, 2007, 2008; Geniez *et al.*, 2007; Kaliontzopoulou *et al.*, 2012). Las grandes diferencias observadas entre los linajes reunidos bajo la denominación de *P. hispanica* han llevado a identificar estos linajes como especies distintas (lista patrón de la Asociación Herpetológica Española, 2014). Una de las nuevas especies que han surgido de la división de *P. hispanica* es la lagartija parda *Podarcis liolepis*, que agrupa a las lagartijas *P. hispanica* del noroeste y este de la Península Ibérica (Renoult *et al.*, 2010; Kaliontzopoulou *et al.*, 2011).

Objetivo 1 Estudio del dimorfismo sexual y la estacionalidad en el tamaño del cerebro y la proliferación celular en el telencéfalo (Capítulos 4 y 5)

El tamaño y los niveles de neurogénesis adulta en determinadas áreas cerebrales de algunos vertebrados (e.g. en el sistema del canto de las aves canoras o en el hipocampo de aves que almacenan alimento y de topillos polígamos) son sexualmente dimórficos y/o varían estacionalmente (véase Capítulo 1). Estas áreas cerebrales controlan determinados comportamientos (el canto, el almacenamiento de alimento, el uso del espacio doméstico) que difieren también entre los sexos y/o varían con la estación (Barnea & Nottebohm, 1994; Kirn *et al.*, 1994; Galea & McEwen, 1999). En *Podarcis*, el comportamiento reproductivo, y posiblemente también la quimiorrecepción y el comportamiento espacial, presentan diferencias ligadas al sexo y varían estacionalmente (Gil *et al.*, 1988; Pérez-Mellado, 1997; Barbosa *et al.*, 2006). Como en aves canoras y topillos, esta variación podría estar relacionada con una variación sexual y estacional en la neurogénesis adulta. El primer objetivo de la tesis es, por tanto, estudiar la variación sexual y estacional en la neurogénesis adulta en los lagartos, examinando la variación sexual y estacional en el tamaño del cerebro y la proliferación celular en el telencéfalo de *P. liolepis* (Capítulos 4 y 5).

Objetivo 2 Estudio de los niveles hormonales en relación al dimorfismo sexual y la estacionalidad en el tamaño del cerebro y la proliferación celular en el telencéfalo (Capítulos 4 y 5)

La testosterona, directamente o transformada en estradiol, estimula la diferenciación sexual del sistema nervioso durante el periodo fetal y perinatal y activa el comportamiento reproductivo en los adultos (Balthazart & Foidart, 1993; Cooke *et al.*, 1998; Forlano *et al.*, 2006; Wade, 2012). Además, en los animales con reproducción estacional, la testosterona estimula cambios estructurales en el cerebro y desencadena el comportamiento reproductivo en determinados periodos del año (generalmente la primavera; Tramontin & Brenowitz, 2000; Galea, 2008). En esta tesis estudiamos los niveles de testosterona y estradiol de *P. liolepis* por su importancia en la formación de dimorfismos sexuales en el cerebro y por la acción activadora que estacionalmente ejercen sobre el cerebro y la reproducción. También estudiamos la variación estacional en los niveles de corticosterona, ya que esta hormona se considera a menudo un antagonista de las hormonas sexuales. Hormonas esteroides como la testosterona, el estradiol o la corticosterona regulan la neurogénesis adulta en muchos vertebrados y a menudo son responsables de que la neurogénesis adulta sea sexualmente dimórfica y/o varíe estacionalmente (Tramontin & Brenowitz, 2000; Galea, 2008). En los Capítulos 4 y 5 estudiamos también el efecto de las hormonas esteroides sobre la variación sexual y estacional en el tamaño del cerebro y la proliferación celular en el telencéfalo en *P. liolepis*.

Objetivo 3 Estudio del dimorfismo sexual y la estacionalidad en la tasa de migración de nuevas células en el telencéfalo (Capítulo 6)

Las nuevas células migran desde la zona ventricular a sus lugares de destino a través del parénquima cerebral. La mayoría de trabajos que han estudiado la migración de las nuevas células se han centrado en los mecanismos moleculares y celulares mediante los cuales las nuevas células alcanzan estos lugares (e.g. Lois *et al.*, 1996). Por el contrario, son muy escasos los estudios que han investigado la existencia de variación (e.g. sexual, estacional) en la cantidad de nuevas células migradoras o los factores ambientales que regulan esta variación (e.g. la temperatura, Ramírez *et al.*, 1997; Peñafiel *et al.*, 2001; Marchioro *et al.*, 2012). En el Capítulo 6 de la tesis estudiamos la influencia del sexo y la estacionalidad en la tasa de migración de nuevas células a sus lugares de destino en *P. liolepis*. Esta tasa de migración se refiere a la cantidad de nuevas células que migran a sus lugares de destino con respecto al total de nuevas células producidas en la zona ventricular. En particular, nos centramos en la tasa de migración de nuevas células a los bulbos olfativos y el cortex medial, y discutimos si la temperatura ambiental podría influir en esta tasa de migración.

Sección II

Material y Métodos

Material

y

Métodos

cap. **3**

3.1 Metodología

Capturamos 50 machos y 50 hembras adultos de la lagartija parda (*Podarcis liolepis*) con un nudo corredizo atado en el extremo de una caña en muros de solares, jardines y huertos en Burjassot (Valencia). Estas capturas se realizaron en cinco campañas realizadas en un año: 2ª quincena de agosto, 1ª quincena de noviembre, 2ª quincena de enero, 1ª quincena de abril y 2ª quincena de junio, por lo que las campañas de captura estaban separadas entre sí aproximadamente dos meses (Fig. 3.1, capturas). En cada campaña capturamos 10 machos y 10 hembras. Utilizamos cinco campañas de captura para poder muestrear ejemplares justo antes de la estación reproductiva, en plena estación reproductiva, y al final de la estación reproductiva (Pérez-Mellado, 1982; Fig. 3.1). Dado que la temperatura y el fotoperiodo son los factores ambientales más importantes en la regulación del ciclo reproductivo de los vertebrados, registramos estos parámetros en los periodos del año en que capturamos los lagartos. Los registros obtenidos indican que los años en que llevamos a cabo la experimentación fueron climatológicamente normales, y no mostraron temperaturas atípicas que pudieran haber alterado el ciclo reproductivo de los lagartos (Tabla 3.2).

Inmediatamente tras la captura, los lagartos fueron transportados al laboratorio, donde recibieron una única inyección intraperitoneal del marcador de proliferación celular 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU; Sigma) con una dosis de 100 µg BrdU / g peso corporal. Durante tres semanas los lagartos fueron alojados en grupos de 5 (2 machos y tres hembras o viceversa) en grandes terrarios (70 x 30 x 40 cm) con substrato de tierra,

Figura 3.1 Periodos de captura y sacrificios utilizados en este estudio con *P. liolepis*

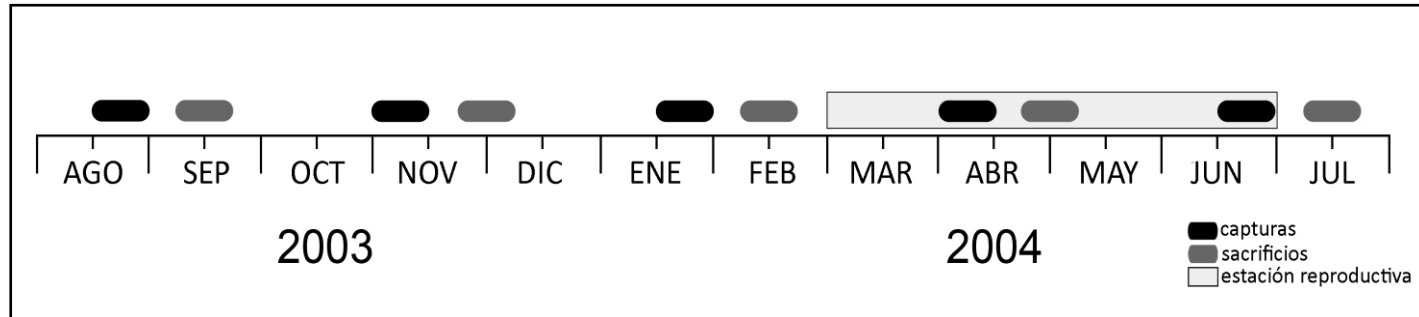


Tabla 3.2 Temperatura media y fotoperiodo durante el mantenimiento de los lagartos

	AGO → SEP	NOV → DIC	ENE → FEB	ABR → MAY	JUN → JUL
Temperatura media (°C)	26.2 ± 0.3	14.1 ± 0.4	12.1 ± 0.4	15.1 ± 0.4	25.6 ± 0.2
Horas de luz diarias (h)	13.5 → 12.5	10.5 → 9.5	10 → 11	12.5 → 14	15 → 14.5

placas Petri con agua y fragmentos de ladrillo para termorregular y refugiarse. Durante el mantenimiento, los lagartos fueron alimentados con una dieta insectívora (grillos, larvas de escarabajo de la harina y orugas de mariposa de la miel), y agua *ad libitum*. Los terrarios fueron situados en el exterior para asegurar que las condiciones ambientales en cautividad eran similares a las de su medio natural.

Tras tres semanas en cautividad, los lagartos fueron anestesiados con hidrocloreuro de ketamina (12 μ l / g peso corporal; Ketolar, 50 mg / ml, Pfizer, NY, EEUU; Font & Schwartz, 1989) y perfundidos transcardíacamente con solución salina seguida de una solución fijadora (paraformaldehido 4% tampón fosfato 0,1 M). Los lagartos fueron sacrificados 21 días después de su captura, por lo que los sacrificios de los ejemplares de una misma campaña de captura se realizaron a lo largo de un periodo de 15 días (Fig. 3.1, sacrificios). Los cerebros y las gónadas fueron extraídos, postfijados en solución fijadora durante 4 h y posteriormente mantenidos en tampón fosfato 0,01 M. Los cerebros fueron mantenidos en tampón fosfato durante 4 – 7 días antes de su inclusión en parafina, y durante este tiempo, los medimos y pesamos. Además verificamos el sexo de los individuos y su estado reproductivo inspeccionando las gónadas *post-mortem*.

El mantenimiento y la experimentación se llevó a cabo de acuerdo con las directrices de las instituciones *Animal Behavior Society* y *Association for the Study of Animal Behaviour* (ASAB, 2003), y conforme a la legislación española y europea (RD 223/1988 y Directiva 2003/65/CE). Los lagartos

utilizados en este estudio fueron capturados y sacrificados al amparo de un permiso de la Generalitat Valenciana concedido a Enrique Font.

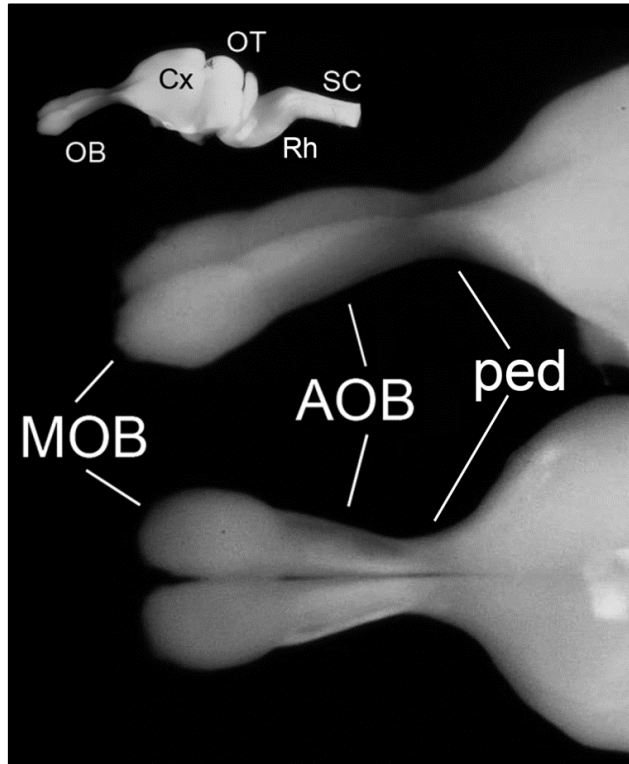
Un macho capturado en abril murió durante el mantenimiento. Dos hembras (una capturada en agosto y otra en junio) fueron descartadas de la muestra por problemas en el procesamiento de los cerebros. Dos de los machos capturados en agosto no fueron incluidos en algunos análisis estadísticos por resultar dañados sus bulbos olfativos durante la extracción del cerebro.

3.1.1 Estudio morfométrico del cuerpo, el cerebro y el bulbo olfativo

Tomamos medidas del cuerpo, cerebro y bulbos olfativos de todos los lagartos capturados. El tamaño corporal fue medido inmediatamente tras la captura como longitud cabeza – cloaca (LCC, ± 1 mm). En los lagartos, la longitud cabeza – cloaca proporciona una mejor estimación del tamaño corporal que el peso, ya que este último varía en gran medida con la alimentación, el grado de hidratación, y en las hembras, con el estado reproductivo. El tamaño del cerebro y de los bulbos olfativos fue medido inmediatamente tras su extracción. Tras eliminar el exceso de fijador, pesamos los cerebros ($\pm 0,1$ mg) con una balanza de precisión (Sartorius 121S), y medimos la longitud de los bulbos olfativos principal y accesorio (MOB, AOB; $\pm 0,1$ mm) con un estereomicroscopio (Leica MZ8) provisto de un micrómetro ocular.

En *P. liolepis*, los bulbos olfativos discurren paralelos al eje longitudinal del cerebro y se unen a los hemisferios cerebrales mediante unos cortos pedúnculos olfativos. Existe una constricción transversal que divide los bulbos olfativos en una porción rostral y elipsoidal, que corresponde a los bulbos olfativos principales, y una porción caudal, los bulbos olfativos accesorios. Los bulbos olfativos accesorios, a su vez, están delimitados caudalmente por una marcada constricción transversal en los pedúnculos olfativos. Las constricciones transversales permiten una diferenciación macroscópica de los bulbos olfativo principal y accesorio en los cerebros fijados (Fig. 3.2). Los bulbos olfativos principal y accesorio son estructuras alargadas, y su longitud es un buen indicador de su tamaño. Por último, medimos la longitud del cerebro ($\pm 0,1$ mm) desde el límite caudal del bulbo olfativo accesorio hasta la región posterior del cerebelo. Esta medida abarca casi la totalidad del cerebro, excluyendo únicamente la parte más caudal del tronco del encéfalo y los bulbos olfativos. Medidas similares a las tomadas en este estudio han sido utilizadas en estudios previos (e.g. Healy & Guilford, 1990).

Figura 3.2 (página 78) Vista lateral del cerebro de *P. liolepis* y detalle de los bulbos olfativos. En la vista ventral del bulbo olfativo accesorio (AOB), podemos distinguir por transparencia el ventrículo lateralizado. Cx, córtex; MOB, bulbo olfativo principal; OB, bulbo olfativo; OT, techo óptico; ped, pedúnculo olfativo; Rh, rombencéfalo; SC, médula espinal.



3.1.2 Estudio de la neurogénesis adulta en el telencéfalo de *P. loiolepis*

Immunocitoquímica de BrdU y análisis cuantitativo en áreas telencefálicas

Para el marcaje de BrdU, los cerebros fueron deshidratados e incluidos en parafina. A continuación realizamos cortes transversales del telencéfalo de un grosor de 7 μm y los montamos en tres series sobre portaobjetos gelatinizados. Las series fueron desparafinadas en xileno e hidratadas en alcoholes de concentración decreciente hasta agua destilada. Procesamos los portaobjetos para inmunocitoquímica de BrdU en grupos de 20 con muestras

de los dos sexos y de todas las estaciones del año de estudio. Cada grupo fue tratado primero con H_2O_2 para el bloqueo de la peroxidasa endógena, y a continuación con HCl 2 N, para desnaturalizar el ADN, neutralizado posteriormente con tampón borato 0,1 M pH 8,4. Los portaobjetos fueron seguidamente incubados durante una hora en una solución de bloqueo con un 10% de suero normal de cabra (Sternberger, Baltimore, MD, USA), seguida de una incubación durante toda la noche con anticuerpo monoclonal de ratón contra BrdU (Dako, Dinamarca). Al día siguiente, los portaobjetos fueron incubados en una solución con anticuerpo biotilado anti-ratón de cabra (Vector, Burlingame, CA, USA), seguido por una incubación en complejo ABC (Vector). La actividad peroxidasa fue detectada utilizando 3-3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma). La DAB produce una reacción oscura en los núcleos de las células que incorporaron BrdU en el momento de la inyección y en su progenie. Finalmente, los portaobjetos fueron lavados en agua destilada, deshidratados y montados en Permount (Fisher, Fair Lawn, NY, USA).

Llevamos a cabo recuentos de células positivas en BrdU (BrdU+) en el hemisferio derecho del telencéfalo. Los ventrículos laterales en los reptiles se extienden rostralmente hasta los bulbos olfativos principales, de modo que iniciamos los recuentos en la primera hemisección del bulbo olfativo principal en la que el ventrículo lateral era visible. Contamos todas las células BrdU+ cada 12 hemisecciones desde esta primera hemisección hasta el telencéfalo caudal. Las hemisecciones en las que contamos células estaban por tanto separadas 84 μ m, para evitar contar la misma célula BrdU+ en distintas

secciones. En nuestros recuentos no incluimos las células endoteliales y la glía asociada a vasos sanguíneos que identificamos por su núcleo alargado y semicircular, así como por su proximidad a vasos sanguíneos. Los recuentos se realizaron directamente con un microscopio Leica DM LB en campo claro a 400 aumentos. Examinando la posición y forma del ventrículo, fue posible identificar y delimitar con seguridad las principales áreas telencefálicas. Para identificar los límites de las capas de células en estas áreas utilizamos microscopía de contraste de fases. Este método de recuentos de proliferación celular se ha utilizado en estudios similares (e.g. Lavenex *et al.*, 2000b).

Doble inmunofluorescencia de BrdU / doblecortina en los bulbos olfativos

En los bulbos olfativos, además de realizar recuentos de células BrdU+, determinamos el fenotipo de algunas de estas células. Una de las series de parafina fue procesada para un doble marcaje fluorescente de BrdU y doblecortina. La doblecortina es una proteína asociada a microtúbulos que expresan las neuronas inmaduras (Gleeson *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2003). Para el doble marcaje, las secciones de cerebro fueron primero desparafinadas en xileno e hidratadas en una cadena de alcoholes de concentración decreciente hasta agua destilada. Las secciones fueron lavadas en tampón fosfato 0,1 M seguido por un pretratamiento con tampón citrato 0,1 M a 90 °C. Tras enfriar a temperatura ambiente, tratamos con HCl 2 N y, a continuación, neutralizamos con tampón borato pH 8,4. A continuación, los portaobjetos fueron incubados en una solución de bloqueo con un 0,1 % de

albúmina de suero bovino (Sigma) y un 5% de leche deshidratada desnatada bovina (Sveltesse, Nestlé). Finalmente, las secciones fueron incubadas durante la noche en una solución con anticuerpo monoclonal anti-BrdU de ratón (Dako) y anticuerpo policlonal anti-doblecortina de cabra (Santa Cruz Labs, CA, USA). Al día siguiente, los anticuerpos primarios fueron lavados y las secciones fueron incubadas en anticuerpo Alexa Fluor 488 anti-ratón de cabra y anticuerpo Alexa Fluor 555 anti-cabra de asno (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, USA). Tras varios lavados en tampón fosfato 0,1 M, las secciones fueron montadas con Fluorsave (Calbiochem, San Diego, CA, USA). Para detectar doble marcaje BrdU/doblecortina, analizamos nuestras muestras con un microscopio confocal Leica TCS/SP2 equipado con un objetivo de inmersión 40x APO. Para excluir los falsos positivos por la superposición de marcas de distintas células, las células BrdU+ fueron analizadas examinando toda su extensión en el eje Z.

3.1.3 Estudio de la morfología de las gónadas y de los niveles plasmáticos de hormonas esteroides

El estudio de la morfología de las gónadas nos permitió verificar *post mortem* el sexo de los individuos y su estado reproductivo. Las gónadas fueron extraídas tras la perfusión de los ejemplares sacrificados, postfijadas en solución fijadora durante 4 h, y posteriormente mantenidas en tampón fosfato 0,01 M. En los machos, tras eliminar el exceso de fijador, pesamos los testículos ($\pm 0,1$ mg) con una balanza de precisión (Sartorius 121S), y medimos

sus diámetros máximo y mínimo ($\pm 0,1\text{mm}$) con un estereomicroscopio (Leica MZ8) provisto de un micrómetro ocular. En las hembras contamos los folículos vitelogénicos y cuerpos lúteos en el ovario, y los huevos en la cavidad abdominal. También medimos los niveles de testosterona, estradiol y corticosterona en el plasma sanguíneo. Recolectamos muestras de sangre del corazón de los ejemplares realizando una incisión en la aurícula derecha antes de introducir la solución salina en el protocolo de perfusión. La sangre contenida en la aurícula derecha y el ventrículo fue recogida con microcapilares heparinizados de 70 μl . Con este procedimiento conseguimos muestras de 70 – 200 μl de sangre por animal. A continuación sellamos los microcapilares con cera y los centrifugamos a 1000 rpm durante 6 min en una centrífuga para microhematocrito (GRICEL) para separar el plasma sanguíneo del hematocrito. Tras la centrifugación, congelamos los microcapilares hasta realizar el análisis de las hormonas. Evaluamos los niveles en plasma sanguíneo de testosterona y corticosterona en machos, y los niveles de estradiol y testosterona en hembras mediante técnicas enzima-inmunoensayo (ELISA; Tabla 3.3). Para determinar niveles de testosterona y estradiol en plasma utilizamos el *dbc* Direct ELISA Testosterone Kit y el *dbc* Direct ELISA Estradiol Kit (*Diagnostics Biochem Canada Inc.*). Para determinar niveles de corticosterona utilizamos el *IDS* OCTEIA Corticosterone Kit (*Immunodiagnostic Systems Inc.*). Este kit para la corticosterona en plasma se ha utilizado y se utiliza en reptiles (e.g. Franklin *et al.*, 2003; Isberg & Shilton, 2013; Finger *et al.*, 2015).

Los tres kits utilizados se basan en el mismo principio: la competencia entre antígenos marcados y no marcados por la unión a un número limitado de anticuerpos adheridos a la placa multipocillo. En el kit para la testosterona, el antígeno no marcado es la testosterona presente en las muestras, mientras que el antígeno marcado es una testosterona artificial conjugada a peroxidasa de rábano (HRP). Ambas testosteronas se introducen y compiten en el pocillo: cuanto mayor es la concentración de moléculas de testosterona en la muestra, más anticuerpos anti-testosterona adheridos a la placa ocupan y menos anticuerpos libres quedan para la testosterona conjugada a HRP. Tras varios lavados, la concentración de testosterona conjugada a HRP unida a la placa se revela añadiendo trimetilbutilo, un substrato enzimático transparente que vira a azul en presencia de peroxidasa de rábano. La densidad óptica de la disolución, leída en un espectrofotómetro de microplaca, nos informa de la concentración de testosterona en la muestra: a mayor densidad óptica, más testosterona conjugada a peroxidasa de rábano se ha unido al pocillo, por tanto, menor es la concentración de testosterona en la muestra. La concentración exacta de testosterona en la muestra se obtiene en comparación con una recta de calibrado que proporciona el kit. Para validar el uso de los kits con plasma de *P. liolepis* establecimos un paralelismo entre la recta de calibrado que proporcionan los kits y diluciones seriadas de muestras de plasma de *P. liolepis*.

Tabla 3.3 Sensibilidad y especificidad de los kits de hormonas.

KIT	Sensibilidad	Reactividad cruzada con otros esteroides
<i>dbc</i> Direct ELISA Testosterone Kit	0,022 ng/ml de testosterona	5- α -DHT (5,2%) otros esteroides (< 0,1%)
<i>dbc</i> Direct ELISA Estradiol Kit	10 pg/ml de estradiol	Estriol (1,6%) otros esteroides (< 0,1%)
<i>IDS</i> OCTEIA Corticosterone Kit	0,55 ng/ml de corticosterona	11-DHC (6,6%) otros esteroides (< 0,9%)

3.2 Análisis estadísticos

3.2.1 Sexo y estacionalidad en el tamaño del cerebro y la proliferación celular en el telencéfalo

Examinamos simultáneamente la variación sexual y estacional en el tamaño del cuerpo y del cerebro mediante análisis de varianza (ANOVA) cruzados de dos factores, utilizando el sexo de los ejemplares y la época de captura como factores fijos. Como medida representativa del tamaño corporal utilizamos la longitud cabeza-cloaca; del tamaño del cerebro, la longitud y el peso del cerebro. La relación alométrica entre el tamaño del cerebro y del cuerpo fue estudiada mediante regresiones no lineales por el método de ejes mayores reducidos (EMR). En esta regresión, los datos se transformaron previamente en logaritmos (Quinn & Keough, 2002). Como el tamaño del

cerebro correlaciona con el tamaño corporal (véase resultados del Capítulo 4), examinamos la variación sexual y estacional en el tamaño del cerebro relativa al tamaño corporal mediante un análisis de covarianza (ANCOVA) cruzado de dos factores. En este ANCOVA utilizamos la longitud cabeza-cloaca de los ejemplares como covariable. El tamaño de los bulbos olfativos, expresado como longitud de los bulbos, también correlaciona con el tamaño del cerebro (véase resultados del Capítulo 4), por lo que examinamos la variación sexual y estacional en el tamaño de los bulbos relativa al tamaño del cerebro mediante ANCOVA cruzados de dos factores. En este ANCOVA utilizamos la longitud del cerebro sin los bulbos olfativos como covariable. Los ANCOVA eliminan los efectos de la covariable mejor que otros métodos estadísticos (e.g. el análisis de índices de tamaño) y proporcionan un test sensible de los datos ajustados (Bishop & Wahlsten, 1999; Packard & Boardman, 1999; Green, 2001). En los ANCOVA, transformamos las variables en logaritmos para asegurar la homogeneidad de varianza en el rango de la covariable y minimizar el efecto de posibles valores atípicos (Quinn & Keough, 2002).

Examinamos la variación sexual y estacional en la proliferación celular mediante ANOVA cruzados de dos factores, utilizando el sexo de los ejemplares y la época de captura como factores fijos. En primer lugar estudiamos la proliferación celular en el conjunto del telencéfalo en general, realizando ANOVA con los recuentos totales de células BrdU+ y células BrdU+/hemisección en el telencéfalo. A continuación, estudiamos la proliferación celular en cada área telencefálica por separado mediante ANOVA con los recuentos de células BrdU+ por hemisección. Aunque

realizamos recuentos de células BrdU+ en todas las áreas telencefálicas (12 en total), para reducir el número de pruebas estadísticas analizamos únicamente cinco áreas: el córtex medial y las cuatro áreas quimiosensoriales (i.e. bulbos olfativos principal y accesorio, córtex lateral y núcleo esférico).

En aquellos ANOVA y ANCOVA en los que hallamos resultados significativos, realizamos comparaciones múltiples ajustando por Bonferroni para examinar las diferencias entre los grupos. Las regresiones en este estudio fueron realizadas con el *Legendre's Model II Regression Program* (proporcionado por P. Legendre y la Universidad de Montreal). Los demás análisis estadísticos fueron realizados con el programa *SPSS 19.0*.

Los resultados de la estadística de este apartado se muestran en los Capítulos 4 y 5, dedicados al estudio del efecto del sexo y la estacionalidad en los niveles de proliferación celular en el telencéfalo de *P. liolepis*.

3.2.2 Sexo y estacionalidad en la tasa de migración de las nuevas células en el telencéfalo

Migración radial en el córtex medial

Examinamos la variación sexual y estacional en la tasa de migración de nuevas células en el córtex medial de *P. liolepis* mediante un ANCOVA cruzado de dos factores (sexo y época de captura). En este ANCOVA utilizamos la cantidad de células BrdU+ por hemisección en el parénquima del córtex medial como variable y la cantidad de células BrdU+ por hemisección en la

zona ventricular del córtex medial como covariable. El uso de esta covariable nos permitió estudiar variaciones en la cantidad de células migradoras con respecto a la cantidad de células generadas.

Migración tangencial a los bulbos olfativos

Examinamos la variación sexual y estacional en la tasa de migración de nuevas células a los bulbos olfativos de *P. liolepis* mediante ANCOVA cruzados de dos factores (sexo y estacionalidad). Estos ANCOVA se realizaron para la cantidad de células BrdU+ en el MOB y AOB por separado. Para estudiar variaciones en la cantidad de células migradoras con respecto a las generadas en el RMS, utilizamos la cantidad de células BrdU+ por hemisección en los epéndimos retrobulbar y ventromedial como covariable.

En los ANCOVA las variables se transformaron en logaritmos para asegurar la homogeneidad de varianza en el rango de la covariable (Quinn & Keough, 2002). Tras los ANCOVA examinamos las diferencias entre grupos con comparaciones múltiples ajustando por Bonferroni. La estadística fue realizada con *SPSS 19.0*.

Los resultados de la estadística de este apartado se presentan en el Capítulo 6, dedicado al estudio del efecto del sexo y la estacionalidad en la tasa de migración de las nuevas células en áreas telencefálicas de *P. liolepis*.

Sección III

Resultados

**Dimorfismo sexual en el tamaño
del cerebro y la neurogénesis
adulta en *P. liolepis***

cap. **4**

4.1 Introducción

Históricamente, los reptiles han servido como modelos para el estudio de dimorfismos sexuales debido a la considerable diversidad presente en este grupo (Andersson, 1994). Las diferencias sexuales en coloración (Cox *et al.*, 2005; Font *et al.*, 2009), tamaño corporal (Fitch, 1981; Cox *et al.*, 2003, 2007, 2008), longitud de cola y patas (Molina-Borja, 2003), dimensiones de la cabeza (Darwin, 1871; Herrel, 1999) o abanicos gulares (Greenberg & Noble, 1944; Johnson & Wade, 2010) son muy comunes en reptiles. La selección sexual es la principal responsable de la aparición de dimorfismos sexuales en reptiles, principalmente a través de la competencia entre machos (Andersson, 1994) y, en menor grado, a través de la elección de pareja (Tokarz, 1995; Olsson *et al.*, 2002), aunque también se ha discutido el papel de la selección natural en la aparición de estos dimorfismos (Perry, 1996; Herrel, 1999, 2001).

Aunque los dimorfismos sexuales en el cerebro se consideran un fenómeno muy extendido en los vertebrados, la mayoría de estudios que evidencian estos dimorfismos han sido llevados a cabo en aves y mamíferos. Los primeros trabajos que muestran dimorfismos sexuales en el cerebro de reptiles aparecieron en los años 1970. Comparando el cerebro de machos y hembras de varias especies de lagartos y serpientes, Platel halló diferencias sexuales en el peso del cerebro en la mayoría de las especies estudiadas (Platel, 1975). Tras los hallazgos de Platel, la investigación de dimorfismos sexuales en el cerebro de reptiles se ha centrado en la búsqueda de áreas cerebrales sexualmente dimórficas, y no tanto en el estudio del tamaño global del cerebro. Actualmente se han detectado áreas sexualmente dimórficas en

todas las principales divisiones del cerebro de los reptiles. En concreto, se han descrito dimorfismos sexuales en el córtex medial, septum lateral, amígdala, núcleo esférico, área preóptica e hipotálamo ventromedial, y núcleos motores de la médula espinal y el tronco del encéfalo (Stoll & Voorn, 1985; Crews *et al.*, 1990, 1993; Salom *et al.*, 1994; Wade, 1998; O'Bryant & Wade, 1999, 2002a,b; Ruiz & Wade, 2002; Kabelik *et al.*, 2006; Roth *et al.*, 2006; Beck *et al.*, 2008, 2009b).

En algunos estudios con reptiles, los dimorfismos sexuales en el cerebro se han relacionado con comportamientos sexualmente dimórficos (Tabla 4.1). Por ejemplo, los machos de serpientes de la especie *Agkistrodon piscivorus* tienen espacios domésticos más grandes que las hembras, y el córtex medial, área cerebral implicada en la orientación espacial en los reptiles, también es más grande en los machos que en las hembras (Roth *et al.*, 2006). El hipotálamo ventromedial (VMH), que controla la receptividad en las hembras, es más grande en lagartos hembras de la especie *Cnemidophorus inornatus* que en los machos (Crews *et al.*, 1990). El área preóptica, implicada en la expresión de comportamientos masculinos como la monta y la intromisión de los hemipenes, es mayor en machos de lagartos de las especies *C. inornatus*, *Urosaurus ornatus* y *Anolis carolinensis* (Crews *et al.*, 1990; Kabelik *et al.*, 2006; Beck *et al.*, 2008). Durante la estación reproductiva, los machos de *A. carolinensis* cortejan a las hembras extendiendo un abanico gular rojo. Este abanico es más grande en los machos que en las hembras, y únicamente los machos lo extienden durante el cortejo (Greenberg & Noble, 1944). Las motoneuronas que inervan los músculos que controlan el abanico

gular, localizadas en el núcleo ambiguo y en el núcleo ventral motor del nervio facial, son más grandes en los machos que en las hembras (Font & Rome, 1990; Font, 1991; Wade, 1998). También en *A. carolinensis* las motoneuronas de los segmentos espinales T17-S1, que en los machos inervan los músculos que controlan los hemipenes, son más numerosas y tienen somas más grandes en los machos que en las hembras (Ruiz & Wade, 2002).

4.2 Objetivos

En este capítulo estudiamos los dimorfismos sexuales en el tamaño y la neurogénesis adulta en el cerebro de *P. liolepis*. *P. liolepis* depende de la quimiorrecepción para la detección de presas y depredadores y en las interacciones sociales (Gómez *et al.*, 1993; Van Damme & Castilla, 1996; Cooper & Pérez-Mellado, 2002; Font & Desfilis, 2002; López & Martín, 2002, 2005; Desfilis *et al.*, 2003; Carazo *et al.*, 2007, 2008, 2011), por lo que prestamos especial atención a sus áreas quimiosensoriales. Comparamos el tamaño del cerebro y de los bulbos olfativos entre machos y hembras, e investigamos las diferencias sexuales en la proliferación celular en las áreas telencefálicas, algunas de ellas quimiosensoriales. En los bulbos olfativos en particular estudiamos el fenotipo de las nuevas células incorporadas en el adulto. También discutimos cómo las diferencias sexuales en el tamaño y la neurogénesis en el cerebro se relacionan con comportamientos sexualmente dimórficos.

Varios indicios nos llevan a hipotetizar que el cerebro de *P. liolepis* podría presentar dimorfismos sexuales en tamaño y niveles de neurogénesis adulta:

- a) el dimorfismo sexual (machos > hembras) en el tamaño de la cabeza en relación al tamaño corporal descrito en varias especies del género *Podarcis* (Braña, 1996).
- b) la existencia de diferencias sexuales (machos > hembras) en el peso del cerebro descritas en especies de lacértidos filogenéticamente próximos a *P. liolepis*, como *P. muralis* (Platel, 1975)
- c) la existencia de diferencias sexuales en la exploración quimiosensorial y la respuesta a determinados olores en *Podarcis hispanica* (e.g. Gómez *et al.*, 1993; Barbosa *et al.*, 2006; Martín & López, 2006), que podrían ir asociadas a dimorfismos sexuales en las áreas quimiosensoriales.
- d) el sistema de apareamiento en *P. liolepis* es la poliginia, que consiste en que los machos se aparean con varias hembras. Los machos dominantes poseen territorios que engloban los espacios domésticos de varias hembras, con las que se aparean (Gil *et al.*, 1988; Perry & Garland, 2002; Pianka & Vitt, 2003; Carazo, 2010). Como resultado, los machos exhiben una mayor variabilidad en el éxito reproductivo que las hembras, por lo que parece que los machos serían el sexo que estaría sometido a mayores presiones de selección sexual. Estas presiones de selección divergentes entre los sexos favorecen la evolución de dimorfismos sexuales, y en *P. liolepis* algunos de estos dimorfismos podrían localizarse en el cerebro.

Tabla 4.1 Dimorfismo sexual en el cerebro de los reptiles (I)

Áreas cerebrales	Grupo zoológico	Dimorfismo	Comport. sexualmt dimórfico	Referencias
peso del cerebro	lagartos y serpientes	más pesado en machos que en hembras	diferencias sexuales en reproducción	Platel, 1975
cortex medial	serpientes (<i>Akgistrodon piscivorus</i>)	más grande en los machos que en las hembras	espacios domésticos más grandes en los machos	Roth <i>et al.</i> , 2006
septum lateral	lagartos (<i>Gekko gekko</i>)	inervación vasotocinérgica más densa en los machos	diferencias sexuales en la regulación del comportamiento reproductivo	Stoll & Voorn, 1985
	lagartos (<i>Podarcis hispanica</i>)	más neuronas inmunoreactivas al neuropéptido Y en hembras		Salom <i>et al.</i> , 1994
amígdala	lagartos (<i>Urosaurus ornatus</i>)	más grande en los machos	diferencias sexuales en la regulación del comportamiento reproductivo	Kabelik <i>et al.</i> , 2006
	lagartos (<i>Anolis carolinensis</i>)	más grande y con neuronas más grandes en ♂ ; más neuronas en ♀ expresión de receptores de andrógenos más alta en ♀		O'Bryant & Wade, 2002b Beck <i>et al.</i> , 2008, 2009b Rosen <i>et al.</i> , 2002; Kerver & Wade, 2014
núcleo esférico (NS)	lagartos (<i>Gekko gekko</i>)	inervación vasotocinérgica más densa en los machos	diferencias sexuales en la regulación de la reproducción	Stoll & Voorn, 1985
área preóptica, NS, hipotálamo ventromedial	serpientes (<i>Thamnophis sirtalis</i>)	no dimorfismos sexuales en el cerebro	diferencias sexuales en la reproducción	Crews <i>et al.</i> , 1993

Tabla 4.1 Dimorfismo sexual en el cerebro de los reptiles (II)

Áreas cerebrales	Grupo zoológico	Dimorfismo	Comport. sexualmt dimórfico	Referencias
área preóptica (POA)	lagartos (<i>Podarcis hispanica</i>)	más neuronas inmunoreactivas al neuropéptido Y en ♂	expresión de comportamientos sexuales masculinos como la monta o la intromisión de los hemipenes	Crews <i>et al.</i> , 1990; Wade & Crews, 1992; Salom <i>et al.</i> , 1994; Kabelik <i>et al.</i> , 2006; Beck <i>et al.</i> , 2008, 2009b
	lagartos (<i>Urosaurus ornatus</i> , <i>Cnemidophorus inornatus</i> , <i>Anolis carolinensis</i>)	más grande y con neuronas más grandes en los machos		
hipotálamo ventromedial (VMH)	lagartos (<i>Cnemidophorus inornatus</i>)	más grande y con neuronas más grandes en las hembras	expresión de comportamientos sexuales femeninos como la receptividad en las hembras	Crews <i>et al.</i> , 1990 Wade & Crews, 1992 Kabelik <i>et al.</i> , 2006 Beck <i>et al.</i> , 2009b
	lagartos (<i>U. ornatus</i>)	no difieren sexualmente		
	lagartos (<i>A. carolinensis</i>)	más grande en ♂, pero con más neuronas en ♀		
POA, VMH	lagartos (<i>A. carolinensis</i>)	expresión de receptores de estrógenos más en alta en ♀ expresión de receptores de andrógenos más en alta en ♂	expresión de comportamientos sexuales	Beck <i>et al.</i> , 2009a; Cohen <i>et al.</i> , 2012 Kerver & Wade, 2013, 2014
sist. neuromuscular copulatorio	lagartos (<i>Anolis carolinensis</i>)	más y más grandes motoneuronas de segmtos espinales T17-S1 en ♂	control de la musculatura de los hemipenes	Ruiz & Wade, 2002; Holmes & Wade, 2004a
sist. neuromuscular de cortejo	lagartos (<i>Anolis carolinensis</i>)	motoneuronas de Amb X y XI más grandes en ♂	control del abanico gular	Wade <i>et al.</i> , 1998; O'Bryant & Wade, 1999, 2002a

4.3 Resultados

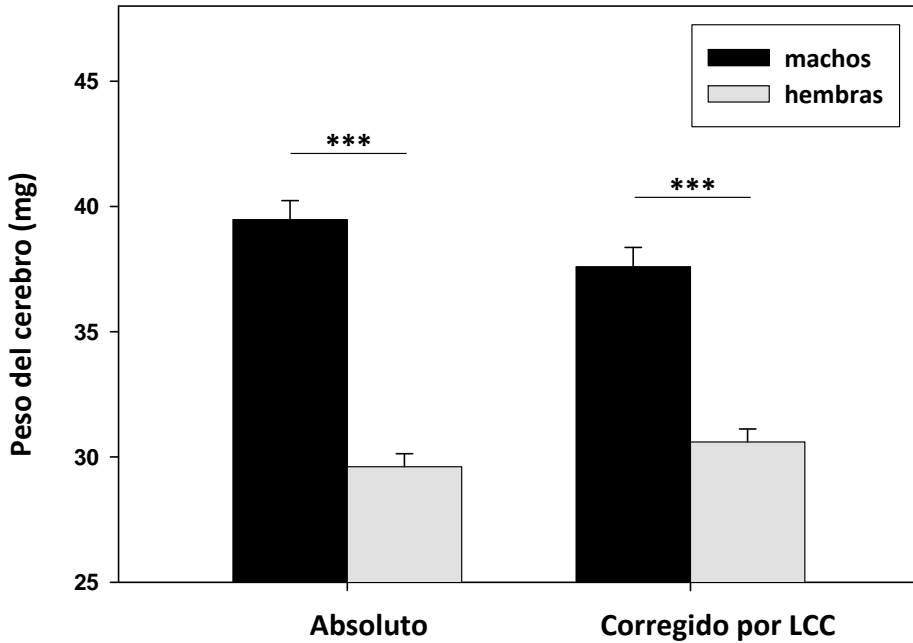
En ningún análisis estadístico (ANOVA o ANCOVA) hallamos una interacción significativa entre el sexo y la época de captura, lo que nos permite presentar los resultados referidos al sexo y la estación de forma independiente. En este capítulo presentamos los resultados de los ANOVA y ANCOVA referidos a diferencias sexuales en el tamaño del cerebro y de los bulbos olfativos, y en la proliferación celular en el telencéfalo. Los resultados referidos a la estacionalidad se presentan en el Capítulo 5.

4.3.1 Estudio morfométrico del cuerpo, el cerebro y el bulbo olfativo de *P. liolepis*

Dimorfismo sexual en el tamaño corporal y del cerebro

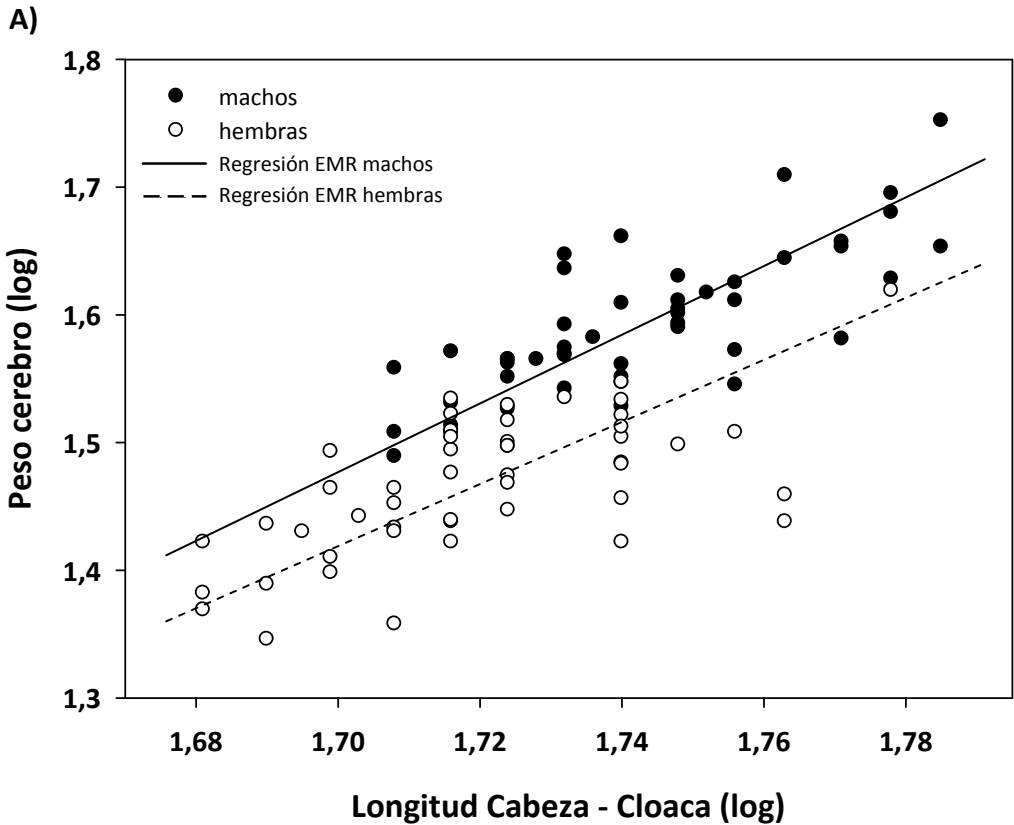
Los machos eran por término medio más grandes que las hembras (♂ $55,4 \pm 0,4$ mm, rango 51-61 mm, ♀ $52,6 \pm 0,4$ mm, rango 48-60 mm; ANOVA sexo: $F_{1, 90} = 27,2, p < 0,001$). Los machos tenían también cerebros más grandes que las hembras, tanto en longitud (♂ $9,3 \pm 0,4$ cm; ♀ $8,0 \pm 0,3$ cm; ANOVA sexo $F_{1, 87} = 334,9, p < 0,001$) como en peso (♂ $39,5 \pm 0,8$ mg; ♀ $29,6 \pm 0,5$ mg; ANOVA sexo: $F_{1, 88} = 177,4, p < 0,001$; Fig. 4.1).

Figura 4.1 Dimorfismo sexual en el tamaño del cerebro en *P. liolepis* en términos absolutos y corregido por la LCC.



La regresión por ejes mayores reducidos (EMR) mostró que el tamaño del cerebro aumenta con el tamaño corporal en *P. liolepis* (Fig. 4.2). El ANCOVA reveló que los machos tienen cerebros más grandes (más largos y pesados) que las hembras también en relación al tamaño corporal (medias relativas: ♂ $9,1 \pm 0,4$ cm, $37,6 \pm 0,8$ mg; ♀ $8,1 \pm 0,3$ cm, $30,6 \pm 0,5$ mg; ANCOVA sexo (longitud): $F_{1, 86} = 399,8$, $p < 0,001$; ANCOVA sexo (peso): $F_{1, 87} = 155,8$, $p < 0,001$; Fig. 4.2).

Figura 4.2 A) Relación entre el tamaño del cuerpo y del cerebro en *P. liolepis*. Regresión por ejes mayores reducidos (ERM) entre el peso del cerebro y la longitud cabeza-cloaca (medidas transformadas en logaritmos [log]). B) Estadística asociada a la regresión por ERM.



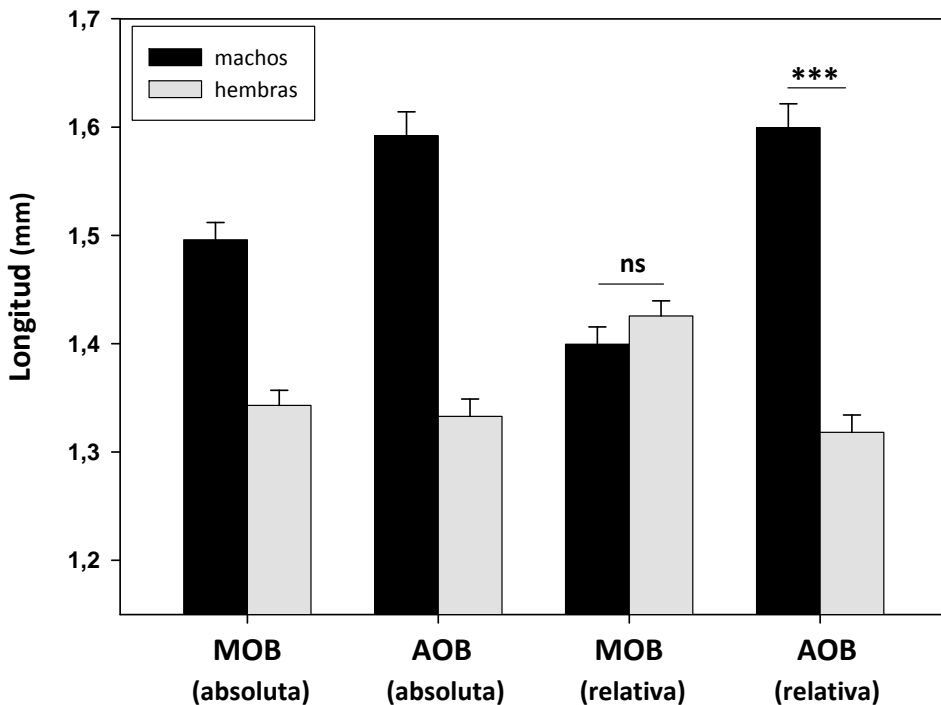
B)

	Pendiente de la recta ERM	Coefficiente de Pearson (<i>R</i>)	<i>p</i>
Machos	2,67	0,774	< 0,001
Hembras	2,44	0,639	< 0,001

Dimorfismo sexual en el tamaño de los bulbos olfativos

La longitud de los bulbos correlaciona con la longitud del resto del cerebro (longitud MOB vs longitud del cerebro sin bulbos: $R = 0,72$, $p < 0,001$; longitud AOB vs longitud del cerebro sin bulbos: $R = 0,57$, $p < 0,001$). Las ANCOVA revelaron que, en relación al resto del cerebro, los machos tienen bulbos olfativos accesorios más largos que las hembras ($F_{1,87} = 21,8$; $p < 0,001$), pero no bulbos olfativos principales mayores ($F_{1,88} = 0,3$, *ns*; Fig. 4.3).

Figura 4.3 Dimorfismo sexual en el tamaño absoluto y relativo de los bulbos olfativos en *P. liolepis*. Medias \pm SEM (error estándar de la media). Longitud relativa de los bulbos calculada utilizando la longitud del cerebro sin los bulbos como covariable.



4.3.2 Estudio de la neurogénesis adulta en el telencéfalo de *P. liolepis*

Distribución de las células BrdU+ en el telencéfalo

Tres semanas tras la administración de BrdU, hallamos células BrdU+ en todas las principales subdivisiones del telencéfalo de *P. liolepis*: bulbos olfativos principal y accesorio, pedúnculo olfativo, núcleo olfativo anterior, córtex, septum, cresta dorsal ventricular, estriado, y núcleo esférico. En los bulbos olfativos principal y accesorio, la mayoría de las células BrdU+ se localizaron en la capa granular, muy próximas al ventrículo (Figs. 4.4 y 4.5). En las demás áreas, las células BrdU+ se encontraron principalmente en la zona ventricular, aunque también hallamos algunas que habían migrado a capas superiores como la capa plexiforme interna o el estrato de somas en las áreas corticales (Fig. 4.4). En conjunto, las células BrdU+ localizadas en la zona ventricular representaban el 62-63% del total de células BrdU+ (Tabla 4.2). Estas células se concentraban principalmente en la región retrobulbar (8%) y en las áreas cerebrales que rodean los sulci de los ventrículos laterales (i.e. el córtex medial, el córtex lateral y el núcleo accumbens; 42%). Por otra parte hallamos muy pocas células BrdU+ en el septum y el córtex dorsomedial (Figs. 4.4 y 4.6). También hallamos células BrdU+ en el hipotálamo, aunque muy escasas y sólo en algunos animales.

Figura 4.4 (página 105) Distribución de células BrdU+ en cuatro secciones representativas del telencéfalo: A) bulbo olfativo principal; B) bulbo olfativo accesorio; C) telencéfalo precomisural; D) telencéfalo postcomisural. La parte izquierda de las imágenes son dibujos realizados a partir de cortes de 7 μm teñidos con azul de toluidina; la parte derecha son dibujos lineales en los que el marcaje con BrdU está representado por puntos negros. El número de puntos negros corresponde con la cantidad media de células BrdU+ contadas en tres secciones de 7 μm no consecutivas del ejemplar en que hallamos una mayor tasa de proliferación celular. Barras de escala: 200 μm .

ADVR, cresta dorsal ventricular anterior; AOB, bulbo olfativo accesorio; Cb, cerebelo; cl, estrato de somas; Cx, córtex; DC, córtex dorsal; DMC, córtex dorsomedial; DT, tálamo dorsal; gl, capa glomerular; gr, capa granular; hl, capa hilar; Hyp, hipotálamo; ipl, capa plexiforme interna; LC, córtex lateral; MC, córtex medial; mgl, capa marginal; ml, capa mitral; MOB, bulbo olfativo principal; mrl, capa mural; NS, núcleo esférico; Oc, quiasma óptico; opl, capa plexiforme externa; OT, techo óptico; ot, tracto óptico; ped, pedúnculos olfativos; Rh, rombencéfalo; SC, médula espinal; sl, sulcus lateralis; sm, sulcus medialis; Sp, septum; Str, estriado; sv, sulcus ventralis; V, ventrículo; VT, tálamo ventral.

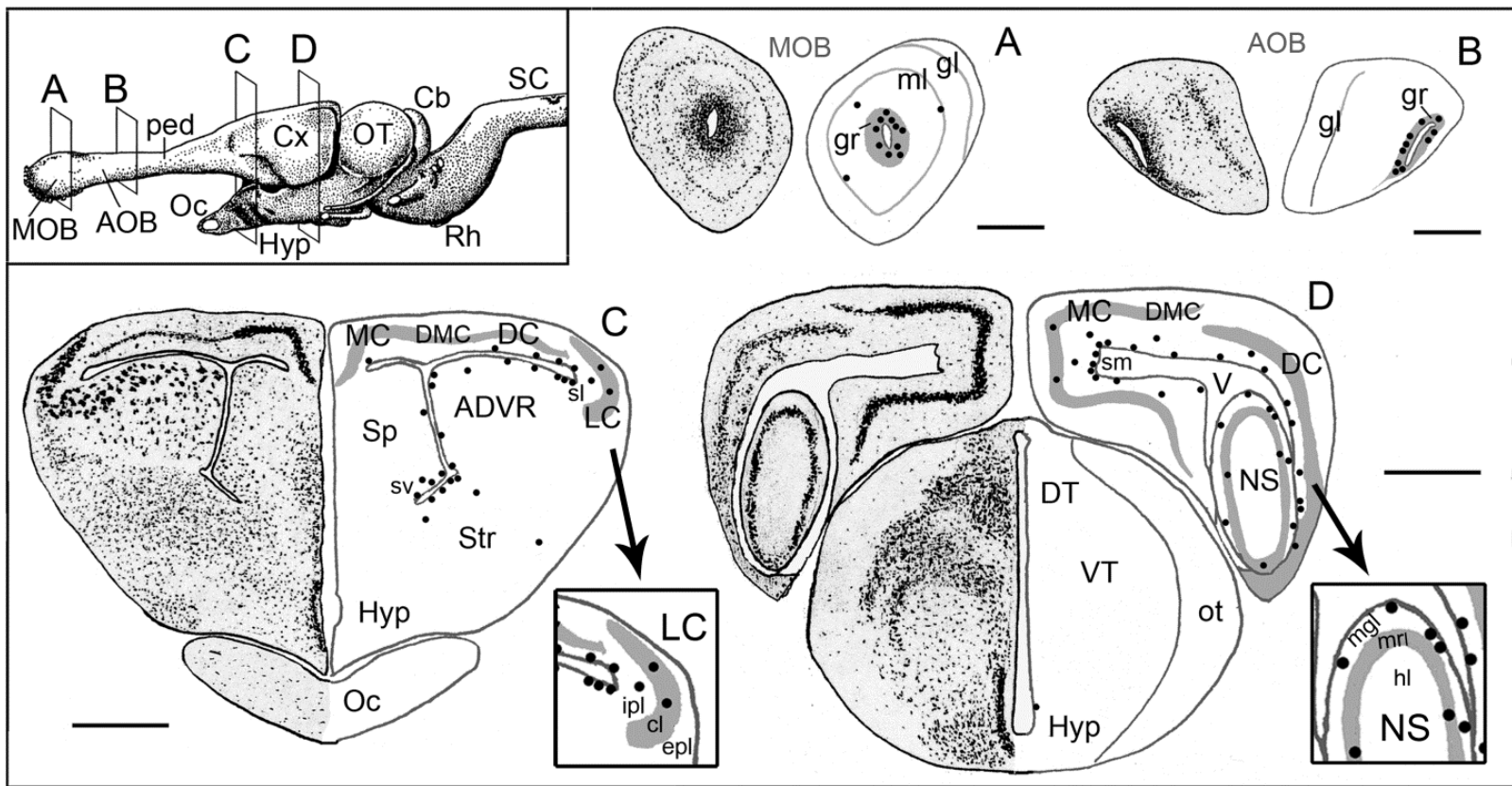
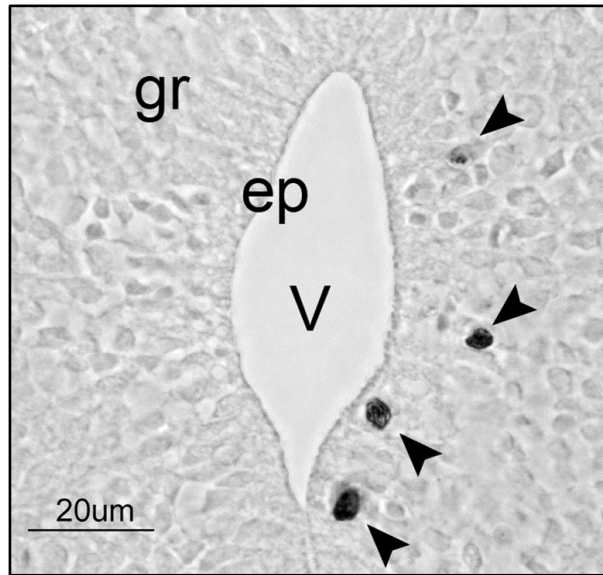


Figura 4.5 Fotomicrografía que ilustra la presencia de cuatro células BrdU+ (teñidas con DAB) en una sección transversal de 7 μm del bulbo olfativo principal. ep, epéndimo; gr, capa granular; V, ventrículo.



EL ANOVA cruzado de dos factores reveló diferencias sexuales significativas en la cantidad de células BrdU+ por hemisección. Hallamos un 85% más de células BrdU+ en el telencéfalo de los machos que en el de las hembras en términos absolutos y un 64% más de células BrdU+ por hemisección (Tabla 4.2). También hallamos más células BrdU+ totales y por hemisección en los machos que en las hembras en todas las áreas telencéfalicas estudiadas (Tabla 4.3, Fig. 4.6).

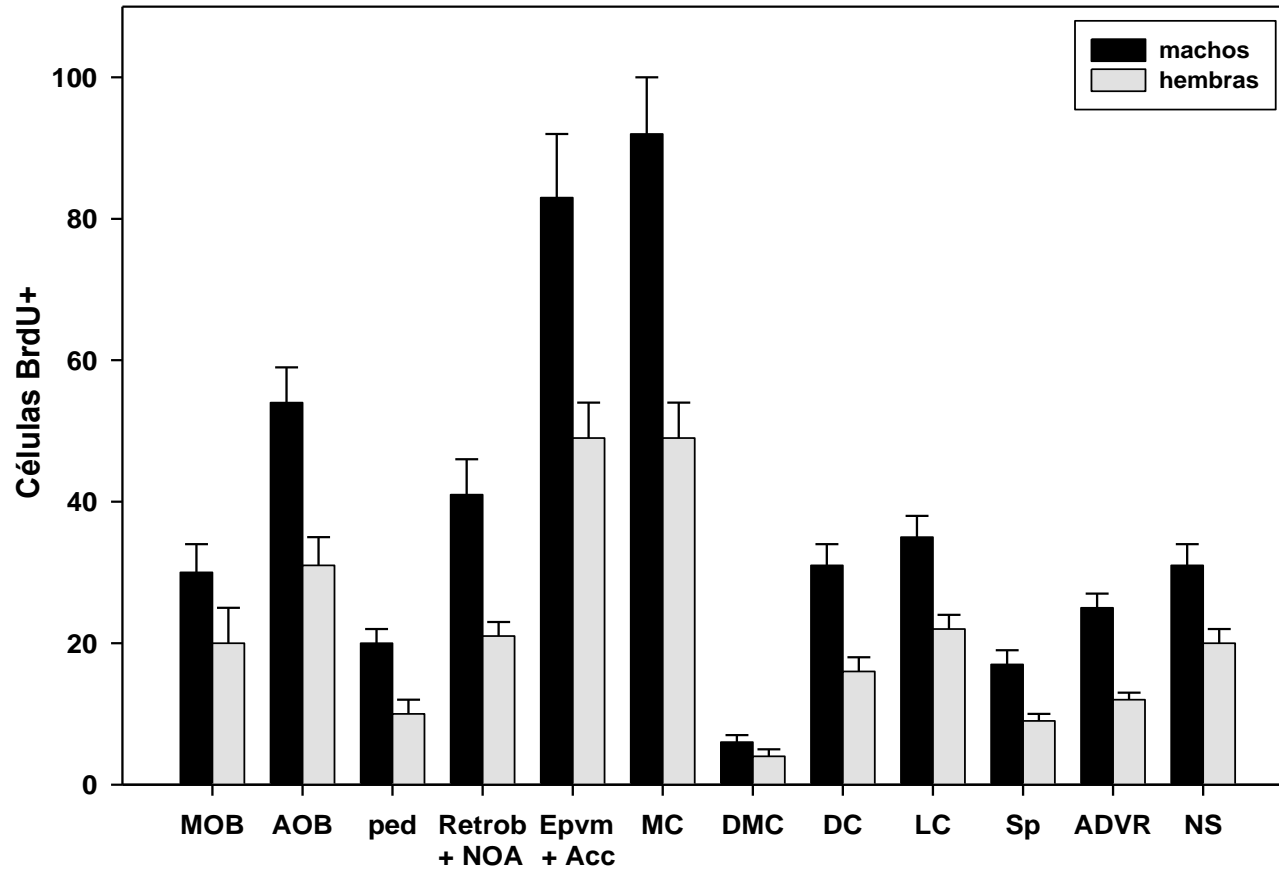
Tabla 4.2 Recuentos (media \pm SEM) de células BrdU+ en el conjunto del telencéfalo de *P. liolepis* tres semanas tras la administración de BrdU.

	MACHOS	HEMBRAS	<i>F</i>_{1,84}	<i>p</i>
Células BrdU+ (total)	502 \pm 39	271 \pm 25	30,5	< 0,001
Zona ventricular (VZ)	317 \pm 27 (63 %)	169 \pm 15 (62 %)		
Parénquima	186 \pm 19 (37 %)	103 \pm 14 (38 %)		
Células BrdU+/hemisec.	8,8 \pm 0,7	5,4 \pm 0,5	19,1	< 0,001
Hemisecciones contadas	58 \pm 1	50 \pm 1		

Tabla 4.3 Recuentos (media \pm SEM) de células BrdU+ en áreas telencefálicas de *P. liolepis* tres semanas tras la administración de BrdU.

Área	Recuentos	MACHOS	HEMBRAS	<i>F</i>_{1,84-87}	<i>p</i>
MOB	total	30 \pm 4	20 \pm 5		
	por hemisec.	2,7 \pm 0,4	1,9 \pm 0,5	11,0	< 0,01
AOB	total	54 \pm 5	31 \pm 4		
	por hemisec.	4,3 \pm 0,4	2,7 \pm 0,3	11,5	< 0,01
MC	total	92 \pm 8	49 \pm 5		
	por hemisec.	4,1 \pm 0,4	2,6 \pm 0,2	15,1	< 0,001
NS	total	31 \pm 3	20 \pm 2		
	por hemisec.	5,6 \pm 0,6	4,0 \pm 0,4	8,8	< 0,01
LC	total	35 \pm 3	22 \pm 2		
	por hemisec.	2,3 \pm 0,2	1,7 \pm 0,1	12,5	< 0,01

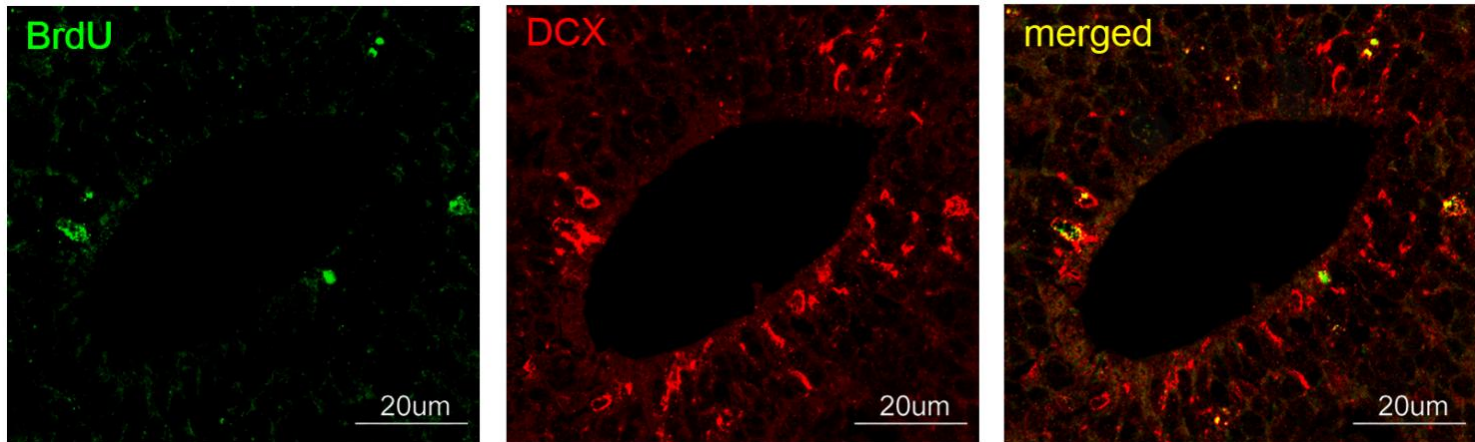
Figura 4.6 Recuentos totales (media \pm SEM) de células BrdU+ en áreas telencefálicas de *P. liolepis* tres semanas tras la inyección de BrdU.



Fenotipo de las nuevas células en los bulbos olfativos

En los bulbos olfativos principal y accesorio estudiamos el fenotipo de las nuevas células con doble inmunofluorescencia BrdU/doblecortina. La gran mayoría de células presentes en los bulbos olfativos que presentaban inmunofluorescencia positiva para BrdU se encontraban en la capa granular, y mostraban inmunofluorescencia positiva también para la doblecortina (Fig. 4.7).

Figura 4.7 Fotomicrográficas de fluorescencia confocal que ilustran la colocalización de BrdU (verde) con doblecortina (DCX, rojo) en células granulares del bulbo olfativo principal.



4.3.3 Resumen de los principales resultados

- 1) Los machos de *P. liolepis* adultos tienen cerebros más grandes en términos absolutos y relativos que las hembras (Fig. 4.1).
- 2) Los bulbos olfativos de los machos de *P. liolepis* son más grandes que los de las hembras: el bulbo olfativo principal en términos absolutos y el bulbo olfativo accesorio en términos absolutos y también en relación al tamaño del cerebro (Fig. 4.3).
- 3) Los machos de *P. liolepis* adultos producen más células en el telencéfalo que las hembras, controlando estadísticamente las diferencias en tamaño corporal y del cerebro ligadas al sexo (Tabla 4.2). Esta diferencia en proliferación celular se observó también cuando estudiamos determinadas áreas telencefálicas por separado como el córtex medial o las áreas quimiosensoriales (Fig. 4.6, Tabla 4.3).

4.4 Discusión

4.4.1 Dimorfismo sexual en el tamaño del cerebro

Los machos de las aves tienen mayores cerebros que las hembras en términos absolutos; sin embargo, las hembras tienen mayores cerebros que los machos en relación al tamaño corporal (Garamszegi *et al.*, 2005). Los machos de los mamíferos tienen cerebros más grandes que las hembras en términos absolutos (Stephan *et al.*, 1981), y en algunos casos, también en relación al tamaño corporal (e.g. los humanos; Ankney, 1992). Los machos de *P. liolepis* tienen cerebros más grandes que las hembras en términos absolutos y también en relación al tamaño corporal. Con *P. liolepis*, la evidencia de dimorfismo sexual en el cerebro de los reptiles aún se restringe a una decena de especies (Platel, 1975), por lo que no es posible deducir una tendencia general en el dimorfismo sexual en el tamaño del cerebro en los lagartos. Sin embargo, los lagartos machos suelen tener cabezas más grandes que las hembras (Braña, 1996; Olsson & Madsen, 1998) y el tamaño de la cabeza correlaciona estrechamente con el tamaño del cerebro (Striedter, 2005). Es probable, por tanto, que la mayoría de los lagartos machos tengan, como *P. liolepis*, cerebros más grandes que las hembras.

Viendo que los lagartos machos tienen mayores cabezas y cerebros que las hembras, podríamos pensar que el cerebro en los lagartos simplemente ha seguido la evolución del tamaño de la cabeza. Así, los machos tendrían cerebros más grandes que las hembras simplemente porque sus cabezas son más grandes. Sin embargo, el tejido nervioso es el tejido más costoso en términos de producción y mantenimiento de todo el organismo

(Williams & Herrup, 1988; Foley *et al.*, 1991; Aiello & Wheeler, 1995; Isler & Van Schaik, 2006), e invertir en él sin una función determinada supondría un coste demasiado elevado para permitir el crecimiento evolutivo de la cabeza. Es más probable que el mayor tamaño del cerebro de los machos de *P. liolepis* se deba a que proporciona ventajas en contextos como la competencia intraspecífica, interespecífica o por el alimento.

4.4.2 Dimorfismo sexual en la proliferación celular en el telencéfalo

Tres semanas tras la administración de BrdU, hallamos una gran cantidad de células BrdU+ en el telencéfalo de *P. liolepis*. Utilizamos un periodo de supervivencia de tres semanas tras la inyección de la BrdU para permitir que la mayor parte de las nuevas células migraran desde la zona ventricular hasta sus lugares de destino en los bulbos olfativos y el parénquima cerebral, y se diferenciaron en neuronas (López-García *et al.*, 1990a,b; Pérez-Cañellas & García-Verdugo, 1996; Font *et al.*, 2001). Sin embargo, los recuentos de las células BrdU+ mostraron una distribución muy distinta: la gran mayoría de las células BrdU+ (más del 60%) se hallaron en la zona ventricular, principalmente en áreas sulcales; alrededor de un 20% se hallaron en el pedúnculo y los bulbos olfativos, principalmente en la capa granular; y el resto, repartidas en el parénquima de áreas telencefálicas como el córtex, ADVR, septum, núcleo accumbens o núcleo esférico. La diferenciación neuronal suele ocurrir fuera de la zona ventricular, por lo que es probable que la mayoría de las células BrdU+ en la zona ventricular fueran células indiferenciadas que aún no habían migrado.

La distribución de células BrdU+ a lo largo del telencéfalo descrita en el párrafo anterior fue similar en machos y hembras; sin embargo, hallamos claras diferencias en la cantidad de células BrdU+ entre ambos sexos. En el telencéfalo de los machos hallamos alrededor de 500 células BrdU+ por las 270 de las hembras (recuentos en el hemisferio cerebral derecho). Teniendo en cuenta que contamos las células marcadas en una de cada 12 hemisecciones de telencéfalo, estimamos que tras una única inyección de BrdU, los machos tenían alrededor de 6000 células marcadas en cada hemisferio cerebral, y las hembras 3200. Estas estimaciones no pretenden ser precisas y podrían estar sobreestimando la cantidad de células marcadas. Sin embargo, nos proporcionan una idea del gran potencial neurogénico así como de las grandes diferencias entre sexos en proliferación celular en el telencéfalo de *P. liolepis*. Ésta es la primera vez que se describe proliferación celular sexualmente dimórfica en el cerebro de un reptil. Hasta el momento, neurogénesis adulta sexualmente dimórfica se había descrito en los núcleos de control del canto de aves canoras (Rasika *et al.*, 1994; Katz *et al.*, 2008), en el bulbo olfativo accesorio e hipocampo de roedores (Galea & McEwen, 1999; Tanapat *et al.*, 1999; Peretto *et al.*, 2001; Nunez-Parra *et al.*, 2011), y en el hipotálamo y cerebelo de algunos peces teleósteos (Zikopoulos *et al.*, 2001; Ampatzis & Dermon, 2007).

4.4.3 Dimorfismo sexual en la proliferación celular en el córtex medial

El córtex medial de *P. liolepis* destaca entre las demás áreas cerebrales no sólo por tener gran cantidad de células BrdU+ observadas, sino también

por las grandes diferencias en la cantidad de células BrdU+ entre machos y hembras (Tabla 4.3). Se ha sugerido que el córtex medial de los reptiles estaría implicado en el comportamiento y la memoria espacial (e.g. Day *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2002; López *et al.*, 2003). Hasta el momento, diferencias sexuales en la proliferación celular / neurogénesis adulta en áreas cerebrales que regulan el comportamiento espacial en los vertebrados únicamente se habían descrito en el hipocampo de algunos mamíferos. Por ejemplo, los topillos hembra de la especie *Microtus pennsylvanicus* exhiben tasas más altas de proliferación celular hipocámpica y de supervivencia de las nuevas neuronas que los machos, lo que se traduce en un mayor reclutamiento de neuronas en el hipocampo (Galea & McEwen, 1999). También las ratas hembra exhiben tasas más altas de proliferación celular hipocámpica que los machos; sin embargo, muchas de estas nuevas células mueren, de modo que el reclutamiento de neuronas a largo plazo no difiere entre los sexos (Tanapat *et al.*, 1999). Diferencias sexuales en la proliferación celular hipocámpica se han investigado también en ardillas y ratones, aunque con resultados negativos en ambos casos (Lavenex *et al.*, 2000b; Lagace *et al.*, 2007). Tampoco se han hallado diferencias sexuales en la proliferación celular en el hipocampo de aves que almacenan de alimento (Barnea & Nottebohm, 1994).

Los topillos hembra incorporan más neuronas que los machos en el hipocampo en la estación no reproductiva, y sólo en esta época, exhiben mayores habilidades espaciales (Madison & McShea, 1987; Sheridan & Tamarin, 1988; Galea *et al.*, 1995, 1996; Galea & McEwen, 1999). También

algunos estudios con ratas han descrito mayores habilidades espaciales en hembras que en machos (e.g. Perrot-Sinal *et al.*, 1996), como predecirían sus hipocampos más grandes y con mayor proliferación celular (Madeira & Liebermann, 1995; Tanapat *et al.*, 1999; Nuñez *et al.*, 2000). Los machos de las serpientes de la especie *Agkistrodon piscivorus* tienen el córtex medial más grande que las hembras, lo que presumiblemente les permite orientarse mejor en espacios domésticos más grandes (Roth *et al.*, 2006). En los lagartos del género *Podarcis*, como en la mayoría de los lagartos, los machos tienen espacios domésticos más grandes que las hembras, lo que sugiere que machos y hembras difieren en su comportamiento espacial (Gil *et al.*, 1988; Perry & Garland, 2002; Pianka & Vitt, 2003; Carazo, 2010). Las diferencias sexuales en la proliferación celular en el córtex medial de *P. liolepis* podrían ser la base neural para las diferencias en el comportamiento espacial.

4.4.4 Dimorfismo sexual en el tamaño y la neurogénesis adulta en los bulbos olfativos

Dimorfismo sexual en el tamaño de los bulbos olfativos

En este estudio mostramos que los bulbos olfativos principal y accesorio son más grandes – más largos – en los machos que en las hembras de *P. liolepis* en términos absolutos. Este resultado representa la primera demostración de un dimorfismo sexual en los bulbos olfativos de un vertebrado no mamífero, ya que hasta el momento había sido descrito únicamente en los mamíferos: roedores (Segovia *et al.*, 1984; Segovia & Guillamón, 1993; Weruaga *et al.* 2001; Tai *et al.*, 2004; Murias *et al.*, 2007;

Suárez & Mpodozis, 2009), conejos (Segovia *et al.*, 2006), hurones (Waters *et al.*, 2005), zarigüellas (Mansfield *et al.*, 2005) y algunos murciélagos (Frahm, 1981). En la mayoría de los mamíferos estudiados, como en *P. liolepis*, los machos tienen bulbos olfativos más grandes que las hembras. Corrigiendo por el tamaño del cerebro, los machos de *P. liolepis* también tienen bulbos olfativos accesorios más grandes – más largos – que las hembras, pero no mayores bulbos olfativos principales.

En términos absolutos, los bulbos olfativos principales son sexualmente dimórficos, mientras que en relación al resto del cerebro, no lo son. Encontrar este tipo de resultados, aparentemente contradictorios, es muy común en el estudio de la morfología del cerebro cuando utilizamos distintas medidas de referencia o covariables (Bishop & Wahlsten, 1999). Por ejemplo, algunos simios, como los gorilas o los humanos, tienen bulbos olfativos principales más grandes que muchos prosimios e insectívoros en términos absolutos; sin embargo, los prosimios y más aún los insectívoros, tienen bulbos olfativos principales más grandes que cualquier simio en relación al resto del cerebro (Stephan *et al.*, 1981; Striedter, 2005). ¿Qué medida de los bulbos olfativos nos informa mejor de las capacidades quimiosensoriales de estos mamíferos, el tamaño absoluto o el relativo? A pesar de tener bulbos olfativos más pequeños en términos absolutos, muchos insectívoros muestran una mayor dependencia de la quimiorrecepción y mayores capacidades quimiosensoriales que los gorilas y los humanos, como predeciría el mayor tamaño relativo de sus bulbos (Barton *et al.*, 1995; Striedter, 2005). Parece ser, por tanto, que el tamaño relativo de los bulbos

olfativos reflejaría mejor la posesión de determinadas capacidades quimiosensoriales o una mayor dependencia en estas capacidades que el tamaño absoluto.

A diferencia del bulbo olfativo principal, el bulbo olfativo accesorio de *P. liolepis* es sexualmente dimórfico no sólo en términos absolutos, sino también en relación al resto del cerebro (más grande en machos que hembras en ambos casos). En algunos mamíferos, principalmente roedores, el sistema vomeronasal se ha descrito como una red de estructuras sexualmente dimórficas que se inicia en el bulbo olfativo accesorio y termina en el diencéfalo y tronco del encéfalo (revisado en Segovia & Guillamón, 1993; Simerly, 2002). Los datos disponibles en los lagartos siguen siendo escasos y proceden de estudios con pocas especies, pero sugieren que el sistema vomeronasal de los lagartos sería, al igual que en los mamíferos, sexualmente dimórfico en su conjunto. La evidencia aportada por nuestro estudio se une a las obtenidas previamente en otras áreas del sistema vomeronasal de los reptiles en las que también se ha observado dimorfismo sexual: el núcleo esférico, la amígdala, el complejo área preóptica – hipotálamo anterior, y el hipotálamo ventromedial (Stoll & Voorn, 1985; Crews *et al.*, 1990, 1993; Kabelik *et al.*, 2006).

Dimorfismo sexual en la proliferación celular / neurogénesis adulta en los bulbos olfativos y otras áreas quimiosensoriales

Gran parte de las células BrdU+ en el telencéfalo de *P. liolepis* se localizaron en áreas quimiosensoriales como los bulbos olfativos principal y

accesorio y sus respectivas eferencias, el córtex lateral y el núcleo esférico. También hallamos muchas células BrdU+ en las áreas cerebrales donde se originan las neuronas destinadas a los bulbos olfativos como el epéndimo ventromedial que rodea el sulcus ventralis / terminalis o la región retrobulbar, lo que reafirma la creencia de que la neurogénesis adulta en los reptiles tiene una gran importancia en las áreas quimiosensoriales (Font *et al.*, 2001). En los bulbos olfativos, la mayoría de las células BrdU+ fueron inmunoreactivas también a la doblecortina, lo que sugiere que eran neuroblastos o neuronas inmaduras. Las diferencias sexuales en la cantidad de células BrdU+ en los bulbos olfativos, por tanto, reflejan diferencias sexuales en el número de neuronas. Hasta el momento, únicamente se había descrito proliferación celular / neurogénesis adulta sexualmente dimórfica en el bulbo olfativo accesorio en ratas y ratones. En ambos grupos de roedores, los machos incorporan más neuronas que las hembras (Peretto *et al.*, 2001; Nunez-Parra *et al.*, 2011).

Vomerolfacción y dimorfismo sexual en el sistema vomeronasal

La quimiorrecepción en muchos vertebrados es sexualmente dimórfica. Por ejemplo, machos y hembras de algunos anfibios (e.g. salamandras) y varios mamíferos (e.g. ratones, cerdos, humanos) difieren en la sensibilidad, discriminación, identificación o respuesta a olores de conoespecíficos, y en el marcaje químico y la investigación de las marcas olorosas (Sever, 1989; Dorries *et al.*, 1995; Heymann, 1998; Brand & Millot, 2001; Baum & Keverne, 2002; Smith & Gordon, 2002; Peña *et al.*, 2006;

Pierman *et al.*, 2006; Wesson *et al.*, 2006; Doty & Cameron, 2009). En los reptiles, tanto la exhibición de comportamientos quimiosensoriales relacionados con la vomerolfacción (e.g. la exploración con lengüetazos quimiosensoriales) como la respuesta a determinados olores es sexualmente dimórfica. Por ejemplo, serpientes machos del género *Thamnophis* siguen los rastros olorosos de hembras; las hembras, en cambio, no siguen rastros de machos (Mason, 1992). En cuanto a los lagartos, los machos de la especie *Sceloporus occidentalis* dirigen lengüetazos quimiosensoriales a olores de otros machos; este mismo olor no genera respuesta en las hembras (Duvall, 1979). Sólo los machos de *Scincella lateralis* se aproximan a olores de hembras (Duvall *et al.*, 1980). Sólo los machos de *Eumeces laticeps* (Cooper & Vitt, 1984) y *Eublepharis macularius* (Steele & Cooper, 1997) identifican el sexo a partir de marcas olorosas. Sólo las hembras de *Iberolacerta monticola* distinguen químicamente entre morfos (López *et al.*, 2009). En la mayoría de estos estudios, los machos muestran mayores tasas de exploración quimiosensorial o una mayor respuesta a determinados olores que las hembras, lo que podría llevarnos a pensar que los lagartos machos tienen mayores capacidades quimiosensoriales que las hembras. Sin embargo, muchos de estos estudios utilizan olores que teóricamente deberían estimular una mayor respuesta en los machos que en las hembras (por ejemplo, olores de machos rivales), por lo que faltaría observar cómo responden las hembras a olores más importantes para su supervivencia y reproducción.

P. liolepis utiliza la vomerolfacción para explorar el ambiente, detectar presas y depredadores, y en las interacciones sociales (Gómez *et al.*, 1993;

Van Damme & Castilla, 1996; Cooper & Pérez-Mellado, 2002; Font & Desfilis, 2002; Desfilis *et al.*, 2003; Carazo *et al.*, 2007, 2008, 2011). Algunos caracteres relacionados con la vomerolfacción en el género *Podarcis* son sexualmente dimórficos. Por ejemplo, los poros femorales de los machos del género *Podarcis*, que segregan sustancias químicas detectadas por el sistema vomeronasal, son más grandes y producen más secreción que los de las hembras (Mason, 1992). Los machos del género *Podarcis*, pero no las hembras, aumentan la frecuencia de pataleos en respuesta a olores de lagartos (Gómez *et al.*, 1993). Sólo los machos de *Podarcis hispanica* tipo I y II discriminan químicamente entre conespecíficos y heteroespecíficos simpátricos (Barbosa *et al.*, 2006), y distinguen distintos morfotipos de *P. hispanica* (Martín & López, 2006). También el comportamiento quimiosensorial durante el cortejo difiere sexualmente en el género *Podarcis*: los machos inician el cortejo realizando lengüetazos quimiosensoriales a la base de cola de las hembras, y siguen el rastro de sus marcas olorosas; las hembras, en cambio, no siguen los rastros de los machos (Font *et al.*, 2012). La evidencia acumulada sugiere que los machos de *Podarcis* tendrían mayores capacidades quimiosensoriales que las hembras, o al menos una mayor dependencia en estas capacidades, en relación al reconocimiento químico de conespecíficos a través de la vomerolfacción (Gómez *et al.*, 1993; Barbosa *et al.*, 2006; Martín & López, 2006; Font *et al.*, 2012). En salamandras pletodóntidas, el dimorfismo sexual en el órgano vomeronasal se ha asociado con diferencias sexuales en la vomerolfacción (Dawley, 1992, 1998; Dawley & Crowder, 1995; Woodley, 2007; véase Capítulo 1). De forma análoga, es posible que, en *P. liolepis*, el dimorfismo sexual en el tamaño y la neurogénesis en el bulbo

olfativo accesorio y en otras áreas cerebrales quimiosensoriales sea el substrato neural que permita la exhibición de una vomerolfacción sexualmente dimórfica. Los machos de *P. liolepis* dependerían en mayor medida que las hembras de la estimulación vomeronasal en las interacciones sociales y en consecuencia tendrían bulbos olfativos accesorios más grandes y que incorporan más neuronas para poder satisfacer estas demandas quimiosensoriales.

**Estacionalidad en el tamaño del
cerebro y la neurogénesis adulta
en *P. liolepis***

cap. **5**

5.1 Introducción

En muchos lagartos y serpientes que habitan climas templados, la temperatura y el fotoperiodo son los primeros estímulos ambientales que desencadenan la actividad reproductiva estacional (Licht *et al.*, 1969, 1971; Duvall *et al.*, 1982). En estos reptiles, el aumento de las temperaturas y las horas de luz diarias en la primavera estimulan el crecimiento gonadal, la secreción de esteroides sexuales y el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios. Los esteroides sexuales promueven la exhibición de una gran variedad de comportamientos relacionados con la reproducción como la territorialidad, el cortejo o la cópula, actuando sobre determinados centros neurales (Halpern *et al.*, 1982; Moore & Lindzey, 1992; Whittier & Tokarz, 1992; Rhen & Crews, 2001; Tokarz *et al.*, 2002; Latham & Wade, 2010; Wade, 2012). Algunas áreas cerebrales como el septum, la amígdala, el área preóptica, el hipotálamo y algunos sistemas neuromusculares varían durante la estación reproductiva en respuesta a la estimulación hormonal (Tabla 5.1; Crews *et al.*, 1993; Salom *et al.*, 1994; O'Bryant & Wade, 1999, 2002b; Holmes & Wade, 2004b; Kabelik *et al.*, 2006; Beck *et al.*, 2008, 2009b). Por ejemplo, en los machos de lagartos de la especie *Cnemidophorus inornatus*, el complejo área preóptica – hipotálamo anterior crece durante la estación reproductiva, mientras que el hipotálamo ventromedial disminuye de tamaño, lo que estimula el comportamiento reproductivo en los machos (Wade & Crews, 1991). También cambia estacionalmente la morfología de áreas que regulan el cortejo y la cópula en los lagartos del género *Anolis* como el área preóptica, la amígdala y los sistemas neuromusculares que controlan el abanico gular y los

hemipenes (O'Bryant & Wade, 1999, 2002b; Holmes & Wade, 2004b; Beck *et al.* 2008; Wade, 2012).

Algunos estudios han descrito estacionalidad en la proliferación celular en la zona ventricular de algunos reptiles, concretamente en varias especies de lacértidos (*Podarcis hispanica*, *Psammodromus algirus*, *Gallotia galloti*) y en una serpiente (*Thamnophis sirtalis*). Tres estudios han simulado la estacionalidad anual modificando el fotoperiodo y la temperatura en el laboratorio (Ramírez *et al.*, 1997; Peñafiel *et al.*, 2001; Marchioro *et al.*, 2012). Según estos estudios, los parámetros ambientales que caracterizan al invierno, como los fotoperiodos cortos y las bajas temperaturas, inhiben la proliferación celular en la zona ventricular y la migración de las nuevas células en los lagartos (Ramírez *et al.*, 1997; Peñafiel *et al.*, 2001; Marchioro *et al.*, 2012). Sin embargo, falta por demostrar si estos mismos parámetros afectan a la neurogénesis en condiciones naturales. Otros dos estudios, llevados a cabo en lagartos tizones de Tenerife (*Gallotia galloti*), han investigado la neurogénesis adulta en la zona ventricular en animales capturados en distintas estaciones del año (Delgado-González *et al.*, 2008, 2011). Estos estudios han señalado dos máximos en la proliferación celular a lo largo del año, aunque discrepan en qué estaciones del año se producen (primavera y verano en Delgado-González *et al.*, 2008; primavera y otoño en Delgado-González *et al.*, 2011). Por último, un reciente estudio en serpientes de la especie *Thamnophis sirtalis* ha revelado que en otoño aumenta la proliferación celular en la zona ventricular y se acelera la migración de las nuevas células a sus lugares de destino (Maine *et al.*, 2014).

Tabla 5.1 Estacionalidad en el cerebro de los reptiles (I)

Áreas cerebrales	Grupo zoológico	Estacionalidad	Comport. estacional	Referencias
cerebro	lagartos (<i>Anolis carolinensis</i>)	actividad aromatasa más alta en el cerebro de los machos en la estación reproductiva	reproducción estacional	Rosen & Wade, 2001; Cohen & Wade, 2011
áreas telencefálicas	lagartos (<i>Gallotia galloti</i>)	proliferación celular en z. ventricular más alta en primavera y verano; reclutamiento de nuevas neuronas más alto en primavera y otoño	reproducción estacional; estación reproductiva: primavera – verano	Delgado – González <i>et al.</i> , 2008, 2011
áreas telencefálicas	serpientes (<i>Thamnophis sirtalis</i>)	la prolif. celular en z. ventricular aumenta y la migración de nuevas neuronas se acelera en otoño	estacionalidad en la migración y la reproducción	Maine <i>et al.</i> , 2014
septum lateral	lagartos (<i>Podarcis hispanica</i>)	más neuronas inmunoreactivas al neuropéptido Y en verano en las hembras		Salom <i>et al.</i> , 1994
amígdala	lagartos (<i>Anolis carolinensis</i>)	crecen somas de neuronas en primavera; más neuronas en estación no reproductiva	estacionalidad en la regulación del comportamiento reproductivo; estación reproductiva: primavera – verano	O’Bryant & Wade, 2002b; Beck <i>et al.</i> , 2008
	lagartos (<i>Urosaurus ornatus</i>)	crece en verano – otoño en los machos		Kabelik <i>et al.</i> , 2006, 2008
núcleo esférico	serpientes (<i>Thamnophis sirtalis</i>)	ausencia de cambios estacionales		Crews <i>et al.</i> , 1993
septum, NS, VHM	lagartos (<i>Urosaurus ornatus</i>)	ausencia de cambios estacionales	reproducción estacional	Kabelik <i>et al.</i> , 2006, 2008

Tabla 5.1 Estacionalidad en el cerebro de los reptiles (II)

Áreas cerebrales	Grupo zoológico	Estacionalidad	Comport. estacional	Referencias
hipotálamo ventromedial	serpientes (<i>Thamnophis sirtalis</i>)	se atrofia durante la hibernación en las hembras	expresión de comportamientos sexuales femeninos como la receptividad en la estación reproductiva (primavera – verano)	Crews <i>et al.</i> , 1993
	lagartos (<i>Cnemidophorus inornatus</i>)	se atrofia en verano en los machos		Wade & Crews, 1991
	lagartos (<i>Anolis carolinensis</i>)	crece en primavera en machos		Beck <i>et al.</i> , 2008
área preóptica	serpientes (<i>Thamnophis sirtalis</i>)	se atrofia durante la hibernación en las hembras		Crews <i>et al.</i> , 1993
	lagartos (<i>Cnemidophorus inornatus</i>)	crece en verano en los machos	expresión de comportamientos sexuales masculinos como la monta o la intromisión de los hemipenes en la estación reproductiva (primavera – verano)	Wade & Crews, 1991
	lagartos (<i>Urosaurus ornatus</i>)	crece en verano en ambos sexos		Kabelik <i>et al.</i> , 2006
	lagartos (<i>Anolis carolinensis</i>)	más grandes y con neuronas más grandes en primavera en los machos		O'Bryant & Wade, 2002b; Beck <i>et al.</i> , 2008
	lagartos (<i>Podarcis hispanica</i>)	más neuronas inmunoreactivas al neuropéptido Y en verano en los machos		Salom <i>et al.</i> , 1994
sist. neuromuscu- lar copulatorio	lagartos (<i>Anolis carolinensis</i>)	somas de motoneuronas de segmentos espinales T17–S1 crecen en primavera	control de muscula- tura de hemipenes	Holmes & Wade, 2004b
sist. neuromuscu- lar de cortejo		no hay cambios estacionales en motoneuronas	control del abanico gular	O'Bryant & Wade, 1999

5.2 Objetivos

El principal objetivo de este capítulo es evaluar la existencia de estacionalidad en el tamaño y la neurogénesis del cerebro en un lagarto, *P. liolepis*, que habita en un clima mediterráneo. El clima mediterráneo muestra una variación anual en temperaturas de inviernos suaves y veranos cálidos. A diferencia de estudios previos que han simulado la estacionalidad anual en el laboratorio (e.g. Ramírez *et al.*, 1997; Peñafiel *et al.*, 2001; Marchioro *et al.*, 2012), este estudio proporciona un registro más fidedigno de la estacionalidad natural capturando los lagartos en distintas épocas del año y manteniéndolos en condiciones seminaturales (grandes terrarios con luz natural y temperatura ambiental, con muchos refugios y estímulos sociales). Como en el capítulo anterior, en este capítulo prestamos también especial atención a la estacionalidad en las áreas quimiosensoriales de *P. liolepis*, por la gran importancia que tiene la quimiorrecepción en estos animales.

5.3 Resultados

En esta tesis utilizamos ANOVA y ANCOVA cruzados de dos factores para estudiar simultáneamente la influencia del sexo y la época de captura en el tamaño del cerebro y los bulbos olfativos, y en la proliferación celular en el telencéfalo. En este capítulo mostramos los resultados de los ANOVA y ANCOVA referidos a la estacionalidad en estas mismas variables.

5.3.1 Estacionalidad en el tamaño del cerebro

El ANOVA no reveló diferencias estacionales en el tamaño corporal (LCC) de *P. liolepis* (ANOVA estación, $F_{4,90} = 2,2$, $p > 0,05$). En contraste, el cerebro de *P. liolepis* varía estacionalmente en peso y longitud: es más grande en abril–mayo que en el resto del año (Fig. 5.1, Tabla 5.2; comparaciones múltiples: abr-may > resto de estaciones, $p < 0,01$ en todos los casos).

Figura 5.1 Estacionalidad en el tamaño del cerebro en *P. liolepis*. Las barras representan medias \pm SEM del peso absoluto del cerebro en cada época de captura. Los puntos representan medias \pm SEM de la relación Peso absoluto del cerebro (mg) / LCC (mm). Barras negras y puntos blancos, machos; barras gris claro y puntos gris oscuro, hembras.

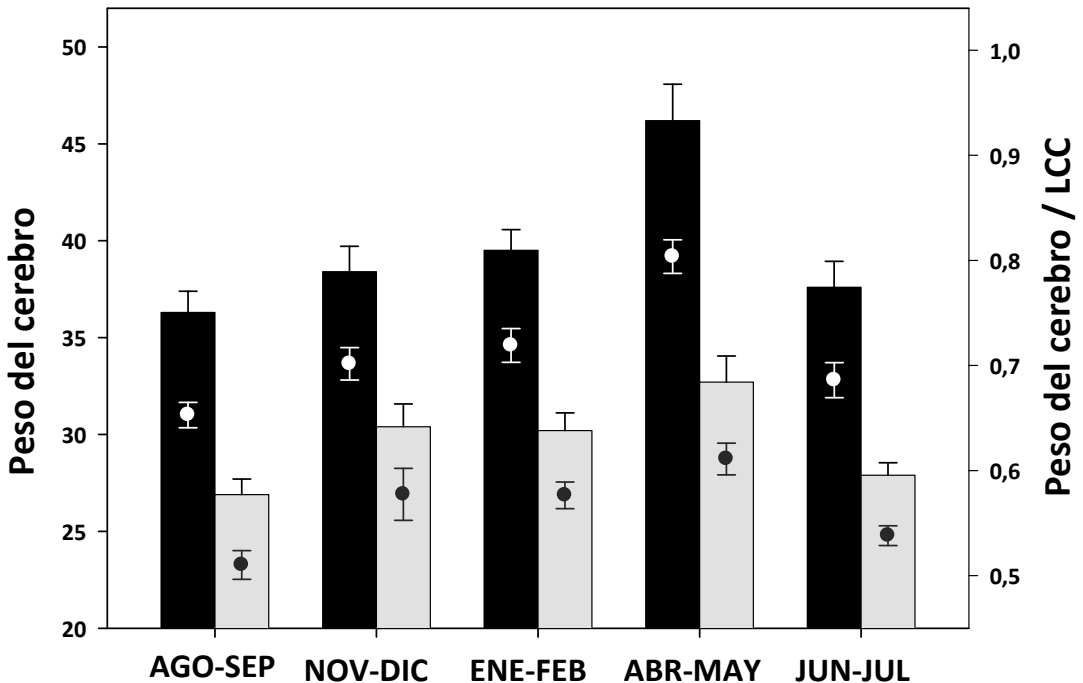


Tabla 5.2 Estacionalidad en el tamaño relativo del cerebro en *P. liolepis*, referido como peso y longitud del cerebro (sin bulbos) corregidos por la LCC.

	ANCOVA	Máximo estacional
Peso relativo del cerebro	$F_{4,87} = 16,7; p < 0,001$	abril–mayo
Longitud relativa del cerebro	$F_{4,88} = 6,0; p < 0,001$	abril–mayo

5.3.2 Estacionalidad en el tamaño de los bulbos olfativos

En relación al resto del cerebro, los bulbos olfativos principales son más grandes (más largos) en animales capturados en agosto–septiembre y en noviembre–diciembre que en animales capturados en junio–julio ($F_{4,88} = 3,8; p < 0,01$; comparaciones múltiples: ago-sep, nov-dic > jun-jul, $p < 0,05$ en ambos casos). Los bulbos olfativos accesorios no varían estacionalmente ($F_{4,87} = 1,0; p > 0,05$).

5.3.3 Estacionalidad en la proliferación celular en el telencéfalo

Los ANOVA revelaron una variación estacional en la cantidad de células BrdU+ por hemisección en el conjunto del telencéfalo, mayor en noviembre–diciembre y abril–mayo que en el resto del año (Tablas 5.3 y 5.4). También hallamos diferencias estacionales en la cantidad de células BrdU+ por hemisección en las cinco áreas telencefálicas en las que realizamos estadística. En estas áreas observamos más células BrdU+ en noviembre–diciembre y en abril–mayo que en enero–febrero y agosto–septiembre (Tabla 5.4; Fig. 5.2).

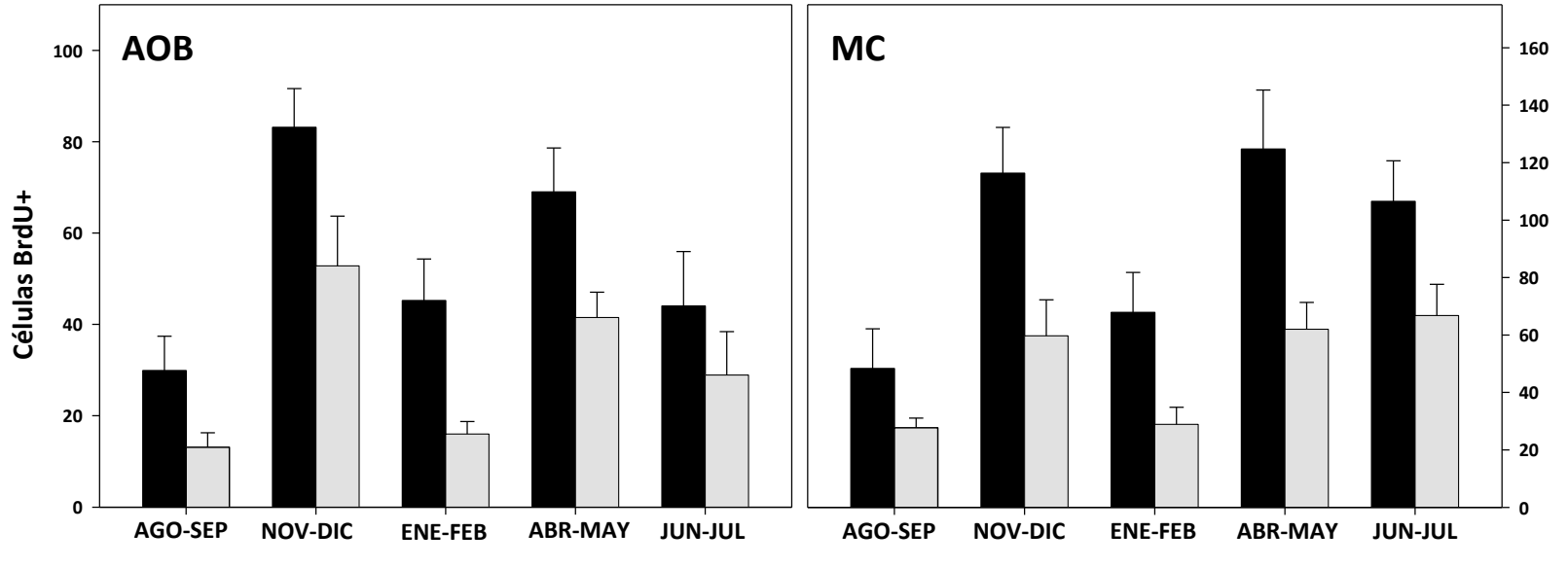
Tabla 5.3 Recuentos (media \pm SEM) de células BrdU+ en el conjunto del telencéfalo a lo largo del año.

	Células BrdU+	AGO-SEP	NOV-DIC	ENE-FEB	ABR-MAY	JUN-JUL
♂	Total	313 \pm 93	721 \pm 74	402 \pm 84	604 \pm 72	422 \pm 69
	Por hemisección	5,6 \pm 1,7	12,5 \pm 1,5	6,9 \pm 1,5	11,0 \pm 1,2	7,2 \pm 1,2
♀	Total	130 \pm 19	363 \pm 62	170 \pm 26	390 \pm 42	291 \pm 67
	Por hemisección	2,6 \pm 0,4	7,0 \pm 1,2	3,3 \pm 0,5	7,7 \pm 0,9	6,1 \pm 1,4

Tabla 5.4 Estacionalidad en la cantidad de células BrdU+ por hemisección en el conjunto de telencéfalo y en áreas telencefálicas de *P. liolepis*. Resultados de ANOVA de dos factores referidos a la estacionalidad.

	<i>F</i>	<i>p</i>	Comparaciones múltiples
Telenc.	$F_{4,84} = 8,7$	$p < 0,001$	nov-dic, abr-may > jun-jul, ago-sep, ene-feb
MOB	$F_{4,85} = 5,6$	$p < 0,001$	nov-dic, abr-may, jun-jul > ago-sep, ene-feb
AOB	$F_{4,85} = 11,0$	$p < 0,001$	nov-dic, abr-may > jun-jul, ago-sep, ene-feb
MC	$F_{4,87} = 7,1$	$p < 0,001$	nov-dic, abr-may, jun-jul > ago-sep, ene-feb
LC	$F_{4,87} = 5,5$	$p < 0,01$	nov-dic, abr-may > jun-jul, ago-sep, ene-feb
NS	$F_{4,87} = 5,0$	$p < 0,05$	nov-dic, abr-may > jun-jul, ago-sep, ene-feb

Figura 5.2 Recuentos totales (media \pm SEM) a lo largo del año de células BrdU+ en distintas áreas telencefálicas. Barras negras, machos; barras grises, hembras.



En el cortex medial y el AOB hallamos las mayores diferencias sexuales y estacionales en proliferación celular del telencéfalo (Tablas 4.3 y 5.4). Para cuantificar el tamaño de estas diferencias, calculamos el estadístico d estandarizado y el intervalo de confianza al 95% asociado. Según Cohen (1988) y Nakagawa & Cuthill (2007), las diferencias se consideran pequeñas, medianas y grandes con valores de d de 0,2, 0,5 y 0,8 respectivamente, y significativas cuando el intervalo de confianza (95%) no incluye el valor 0. El cálculo del tamaño del efecto mostró que las diferencias en este estudio eran significativas (el intervalo de confianza no incluía el valor 0; Tabla 5.5). Según los valores de referencia de Nakagawa y Cuthill (2007), las diferencias sexuales eran medianas, mientras que las estacionales (entre primavera y verano, los valores más extremos) eran grandes (Tabla 5.5).

Tabla 5.5 Cálculo del tamaño de las diferencias sexuales y estacionales en la proliferación celular en el córtex medial y el AOB. Media \pm desviación típica en la cantidad de células BrdU+ por hemisección en machos, hembras, capturados en abr-may y capturados en ago-sep. Estadístico estandarizado d e intervalo de confianza 95% calculados según Nakagawa y Cuthill (2007).

	DIFERENCIAS SEXUALES			DIFERENCIAS ESTACIONALES		
	♂	♀	d (IC 95%)	abr-may	ago-sep	d (IC 95%)
AOB	4,4 \pm 2,9	2,8 \pm 2,4	0,6 (0,2-1,0)	4,5 \pm 2,1	1,5 \pm 1,2	1,7 (0,9-2,5)
MC	4,1 \pm 2,5	2,5 \pm 1,7	0,7 (0,3-1,1)	4,2 \pm 2,5	2,0 \pm 1,6	1,1 (0,4-1,8)

5.3.4 Estacionalidad en la morfología de las gónadas

La morfología de las gónadas de los animales sacrificados nos permitió verificar *post mortem* su estado reproductivo. Los machos sacrificados desde finales de febrero hasta mayo tenían testículos grandes y turgentes, con una apariencia opaca y lechosa indicativa de una espermiogénesis activa propia de la época de apareamiento (Fig. 5.3; Arrayago & Bea, 1988). Los machos sacrificados en otros meses tenían testículos más pequeños y translúcidos. La presencia de folículos vitelogénicos y cuerpos lúteos en el ovario, o huevos en la cavidad abdominal, confirmó que las hembras sacrificadas desde finales de abril hasta julio se encontraban reproductivamente activas coincidiendo con la época de apareamiento, e inactivas el resto del año (Fig. 5.4).

Figura 5.3 Estacionalidad en el tamaño de los testículos en *P. liolepis*

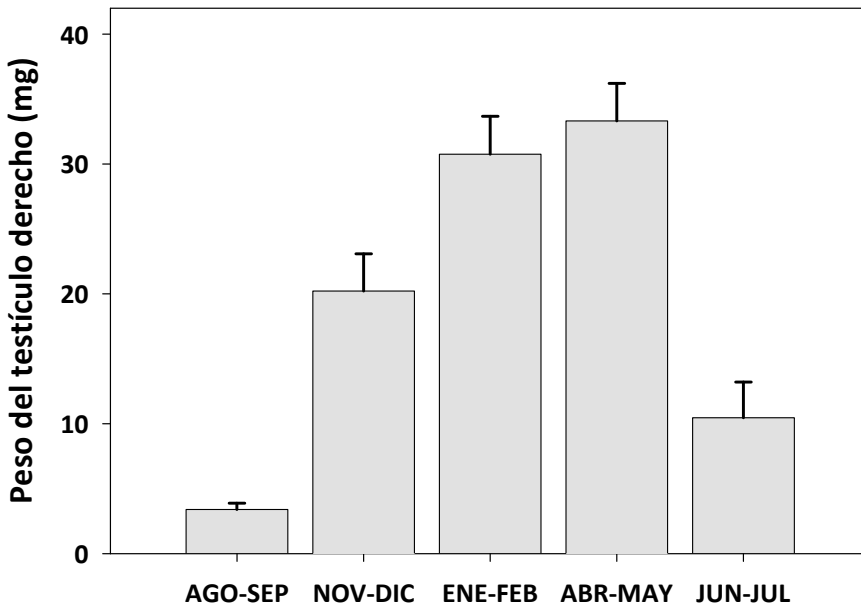
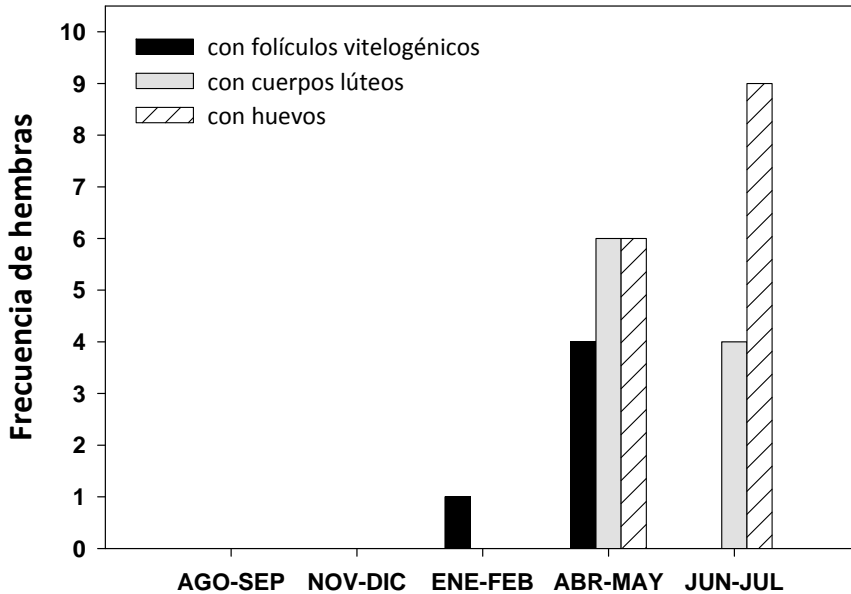


Figura 5.4 Estacionalidad en la condición ovárica de *P. liolepis*.

5.3.5 Estacionalidad en los niveles plasmáticos de testosterona y corticosterona

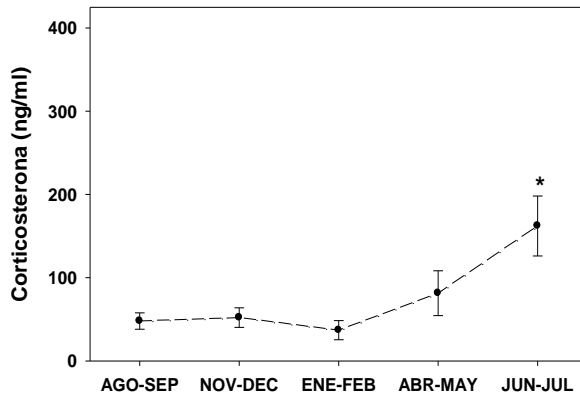
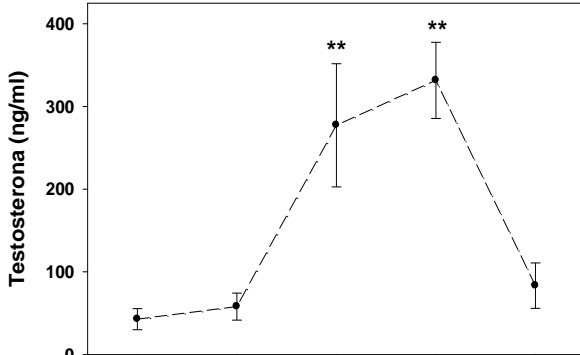
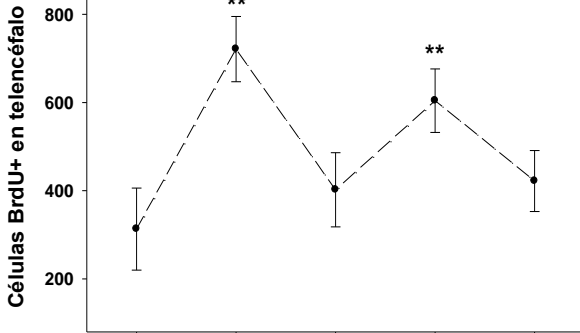
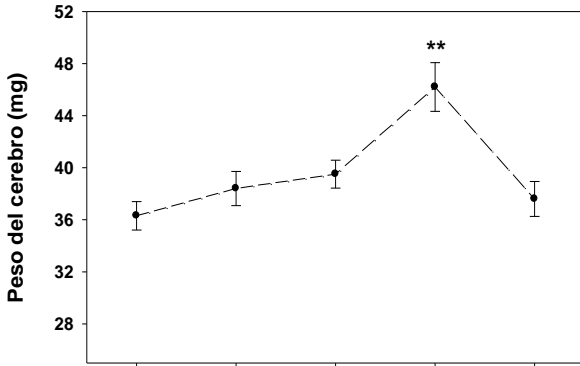
Los niveles plasmáticos de testosterona y corticosterona en los machos mostraron variación estacional (testosterona $F_{4,43} = 9,9$, $p < 0,001$; corticosterona $F_{4,32} = 5,7$, $p < 0,01$). Los niveles máximos de testosterona se observaron desde finales de febrero hasta mayo, coincidiendo con la estación reproductiva, mientras que los de corticosterona se observaron en julio, coincidiendo con el final de la estación reproductiva (Fig. 5.5). Los niveles de testosterona en las hembras no mostraron ninguna estacionalidad significativa (testosterona $F_{4,31} = 1,8$, $p > 0,05$; Fig. 5.5). Los niveles plasmáticos

de estradiol obtenidos en las hembras de *P. liolepis* fueron muy distintos a los descritos en otros lacértidos (e.g. *Psammodromus algirus*; Díaz *et al.*, 1994). Esto nos ha llevado a dudar sobre la especificidad del kit de detección de estradiol, por lo que no incluimos en esta tesis los valores obtenidos en los niveles de estradiol por considerarlos poco fiables.

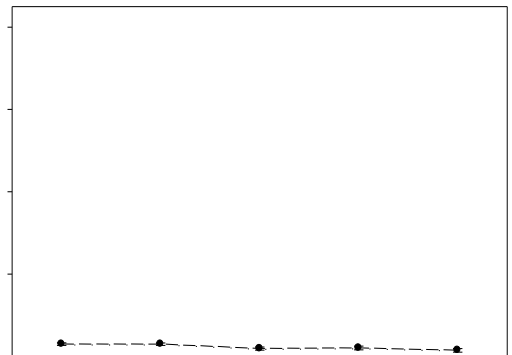
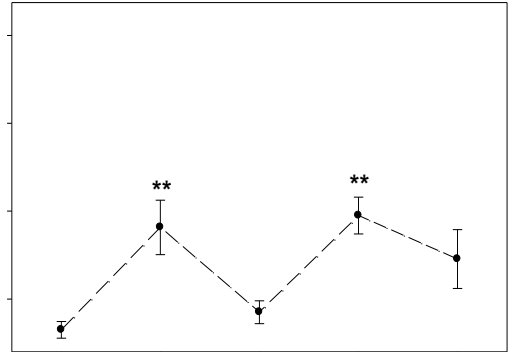
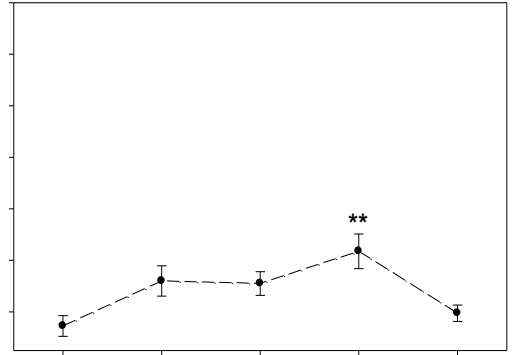
5.3.6 Resumen de los principales resultados

- 1) El cerebro y los bulbos olfativos principales de *P. liolepis* varían estacionalmente, alcanzando su mayor tamaño en primavera (estación reproductiva; Figs. 5.1 y 5.5, Tabla 5.2).
- 2) Los niveles de proliferación celular en el telencéfalo de *P. liolepis* presentan dos picos estacionales: uno en otoño y otro en primavera (Tabla 5.3). Esta estacionalidad en la proliferación celular se observa también cuando estudiamos determinadas áreas telencefálicas por separado como el córtex medial y las áreas quimiosensoriales (Tabla 5.4, Figs. 5.2 y 5.5)
- 3) En primavera, los machos de *P. liolepis* tienen testículos más grandes y niveles plasmáticos de testosterona más elevados. El tamaño de los testículos y los niveles de testosterona disminuyen al final de la primavera, al tiempo que aumentan los niveles plasmáticos de corticosterona (Figs. 5.3 y 5.5).

MACHOS



HEMBRAS



AGO-SEP NOV-DEC ENE-FEB ABR-MAY JUN-JUL

Figura 5.5 Estacionalidad en el tamaño del cerebro, proliferación celular en el telencéfalo, niveles de testosterona y corticosterona en *P. liolepis*. Medias \pm SEM para cada variable en cada estación. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

5.4 Discusión

5.4.1 Tamaño del cerebro, proliferación celular y testosterona

Los lagartos capturados en primavera mostraron un desarrollo gonadal y niveles de esteroides sexuales propios de la estación reproductiva en especies con un ciclo reproductivo estacional asociado (Moore & Lindzey, 1992; Whittier & Tokarz, 1992): los machos tenían grandes testículos espermiogénicos y altos niveles circulantes de testosterona; las hembras tenían folículos vitelogénicos y cuerpos lúteos en los ovarios, y huevos en el abdomen. Estos parámetros reproductivos, similares a los descritos en primavera en condiciones naturales en esta misma especie y otras especies de *Podarcis* de la costa mediterránea, confirmaron que los lagartos capturados durante la primavera eran reproductivamente activos, descartando la posibilidad de que la manipulación y el mantenimiento en cautividad hubieran alterado el ciclo reproductivo normal (Licht *et al.*, 1969; Pérez-Mellado, 1982; Andò *et al.*, 1990, 1992; Castilla & Bauwens, 2000; Martín *et al.*, 2007). El estado reproductivo fue confirmado además por la observación de su comportamiento: sólo desde abril a junio se observaron comportamientos sociales típicos de la época reproductiva (e.g. cortejo y agresiones entre machos) en la naturaleza y durante el mantenimiento en los terrarios.

En primavera, el cerebro de *P. liolepis* es más grande en relación al tamaño corporal y los niveles de proliferación celular en el telencéfalo en conjunto y en las áreas telencefálicas estudiadas aumentan con respecto al invierno. En los bulbos olfativos, el incremento en la proliferación celular

refleja una mayor producción y/o reclutamiento de neuronas. Hasta el momento se ha descrito estacionalidad en la proliferación celular de la zona ventricular en lampreas (Vidal-Pizarro *et al.*, 2004), peces eléctricos (Dunlap *et al.*, 2011), salamandras (Dawley *et al.*, 2000, 2006), ranas (Minelli *et al.*, 1982; Bernocchi *et al.*, 1990; Chetverutkin & Polenov, 1993), lagartos canarios (Delgado *et al.*, 2008, 2011), aves canoras (Kirn *et al.*, 1994), aves que almacenan alimento (Barnea & Nottebohm, 1994; Hoshoooley *et al.*, 2007) y roedores (Huang *et al.*, 1998; Galea & McEwen, 1999). Más de la mitad de las células que se generan en las áreas telencefálicas de estos vertebrados se diferencian en neuronas, por lo que la estacionalidad en la proliferación celular por regla general corresponden con una estacionallidad en la producción de neuronas (Tramontin & Brenowitz, 2000). Como en *P. liolepis*, el tamaño del cerebro y la neurogénesis en estos vertebrados aumentan durante o justo antes de la estación reproductiva, coincidiendo con un mayor desarrollo gonadal y altos niveles circulantes de esteroides sexuales (e.g. Kirn *et al.*, 1994; Brenowitz *et al.*, 1998; Galea & McEwen, 1999; Dunlap *et al.*, 2011).

5.4.2 Un patrón neurogenético estacional con dos picos

La proliferación celular en el telencéfalo de *P. liolepis* mostró un pico en otoño similar al registrado en primavera. Este patrón estacional de dos picos se asemeja a las variaciones estacionales en tamaño del cerebro, neurogénesis y comportamiento descritos en otras especies. Por ejemplo, el patrón estacional de neurogénesis en el HVC de aves canoras tiene dos picos:

un pico principal localizado a inicios de la primavera y dependiente de los esteroides sexuales, y un pico secundario, localizado en otoño y cuya regulación se desconoce (Kirn *et al.*, 1994). Ambos coinciden con periodos de inestabilidad del canto en el que se incorporan nuevas sílabas (Nottebohm *et al.*, 1986). También se han observado dos picos en el tamaño y la neurogénesis del hipocampo de las aves que almacenan alimento. El almacenamiento de alimento en muchos páridos se produce principalmente en otoño. Este almacenamiento de alimento se produce asociado a un aumento en el tamaño y la neurogénesis del hipocampo que distintos estudios ubican en otoño o invierno (Barnea & Nottebohm, 1994; Smulders *et al.*, 1995; Hoshooley & Sherry, 2007; Hoshooley *et al.*, 2007). Sin embargo, algunos años, la abundancia y disponibilidad de alimento permiten un segundo periodo de almacenamiento en la primavera (Pravosudov, 2006). En estos años, el tamaño y la neurogénesis en el hipocampo aumentan de nuevo en la primavera, llegando a alcanzar los niveles registrados en otoño (Smulders *et al.*, 1995; Hoshooley & Sherry, 2007; Hoshooley *et al.*, 2007). Los dos picos de proliferación celular observados en *P. liolepis* podrían estar relacionados con niveles más altos de actividad (i.e. más exploración del entorno y forrajeo) de los lagartos durante la estación reproductiva y en otoño (Desfilis, comunicación personal).

Estudios recientes con lagartos tizones (*Gallotia galloti*) han descrito también dos picos estacionales en la neurogénesis adulta (Delgado-González *et al.*, 2008, 2011). En un primer estudio, en el que los lagartos recibieron una inyección de BrdU y se sacrificaron al día siguiente, hallaron más células

BrdU+ en la zona ventricular en primavera y verano que en invierno y otoño. En este estudio muy pocas células BrdU+ se encontraron fuera de la zona ventricular en el parénquima o los bulbos olfativos (Delgado-González *et al.*, 2008). En un segundo estudio, en el que los lagartos fueron sacrificados un mes después de la inyección de BrdU, aparecieron más células BrdU+ en la zona ventricular en primavera y otoño que en invierno y verano. En este segundo estudio se encontraron también un gran número de células BrdU+ en el parénquima y los bulbos olfativos, que por mostrar marcaje para la doblecortina, fueron identificadas como neuronas (Delgado-González *et al.*, 2011). Aunque los autores manifiestan que los resultados obtenidos en estos dos estudios son coherentes, el análisis de los gráficos presentados revela claras discrepancias. Por ejemplo, la proliferación celular en la zona ventricular durante el otoño es prácticamente inexistente en el primer estudio (Delgado-González *et al.*, 2008); sin embargo, en el segundo estudio es muy elevada (Delgado-González *et al.*, 2011). Una discrepancia similar pero en sentido contrario ocurre con la proliferación celular en verano, que es muy elevada en el primer estudio y escasa en el segundo (Delgado-González *et al.*, 2008, 2011). Diferencias estacionales en el número de divisiones sucesivas de las células germinales o en la muerte celular de las células BrdU+ entre la inyección de BrdU y el sacrificio de los animales podrían explicar las discrepancias entre estos dos estudios, aunque la existencia de estos procesos no se ha demostrado en reptiles (Font *et al.*, 2001). Otros factores como la escasa estacionalidad en el clima canario podría ser también la causa de las discrepancias en estos dos estudios.

En algunos animales, los picos en proliferación celular en el cerebro adulto responden a la regulación de esteroides sexuales como la testosterona. Por ejemplo, la testosterona estimula la proliferación celular en la amígdala de los topillos machos hasta alcanzar sus máximos niveles en primavera (Fowler *et al.*, 2003). De forma similar, es posible que la testosterona estimule la proliferación celular en el telencéfalo de los machos de *P. liolepis*, y sea responsable del pico primaveral en proliferación celular. Sin embargo, el pico otoñal en proliferación celular se produce cuando los machos de *P. liolepis* son reproductivamente inactivos y los niveles de testosterona bajos. El pico otoñal en proliferación celular podría responder a la regulación de otros andrógenos, como la dehidroepiandrosterona (DHEA). En *P. sicula*, una especie próxima a *P. liolepis*, los niveles de DHEA aumentan en otoño (Andò *et al.*, 1990). Por otra parte, es posible también que los niveles de testosterona no regulen la proliferación celular en el telencéfalo de los lagartos y que los altos niveles de testosterona y de proliferación celular en primavera no estén relacionados causalmente. En el giro dentado de los topillos, la testosterona estimula la neurogénesis en la primavera; sin embargo, no influye en los niveles de proliferación celular, sino que estimula la supervivencia de las nuevas neuronas (Ormerod & Galea, 2003). Futuros estudios deberán esclarecer cuál es el papel que desempeñan los esteroides sexuales en la regulación de la proliferación celular y la neurogénesis en los lagartos.

5.4.3 Proliferación celular y corticosterona

A inicios del verano, aumentaron los niveles plasmáticos de corticosterona en los machos de *P. liolepis*, coincidiendo con el final de la estación reproductiva. Tradicionalmente, la corticosterona se ha estudiado en relación al estrés crónico (Wingfield *et al.*, 1997; Romero, 2004; Brummelte & Galea, 2010; Schoenfeld & Gould, 2012). Sin embargo, en condiciones naturales, la corticosterona responde también a factores ambientales (e.g. cambios en la temperatura) y endógenos (e.g. el ciclo reproductivo anual; Dunlap & Wingfield, 1995; Guillette *et al.*, 1995; Woodley & Moore, 2002). En los lagartos, los niveles de corticosterona aumentan durante la estación reproductiva (Daugherty & Callard, 1972; Manzo *et al.*, 1994; Wilson & Wingfield, 1994; De Falco *et al.*, 2004), durante la estación post-reproductiva (Bradshaw, 1986; Moore & Thompson, 1990; Tokarz *et al.*, 1998; Phillips & Klukowski, 2008), o no muestran estacionalidad (Dunlap & Wingfield, 1995). Los altos niveles de corticosterona durante la primavera se producen en respuesta al aumento de las interacciones agonísticas en esta estación (Manzo *et al.* 1994; De Falco *et al.*, 2004). Por el contrario, el aumento de los niveles de corticosterona a inicios del verano marca el final de la estación reproductiva principalmente en los machos (Bradshaw, 1986; Moore & Thompson, 1990; Tokarz *et al.*, 1998). La corticosterona reduce la agresividad, promueve la regresión de los testículos y es responsable de la disminución de los niveles plasmáticos de testosterona durante el verano (Tokarz, 1987; DeNardo & Licht, 1993; Dunlap & Schall, 1995; Tokarz *et al.*, 1998).

La proliferación celular en el telencéfalo de *P. liolepis* mostró sus valores más bajos durante el invierno y el verano. Varias líneas de investigación han identificado la corticosterona como un inhibidor de la neurogénesis (revisado en Schoenfeld & Gould, 2012). El aumento en los niveles de corticosterona al final de la estación reproductiva en *P. liolepis*, por tanto, podría relacionarse con la caída en la neurogénesis adulta durante el verano. Sin embargo, los niveles de proliferación celular también descienden en invierno, cuando los niveles de corticosterona son bajos. El descenso en los niveles de proliferación podría deberse a otras causas, como por ejemplo, el descenso de las temperaturas en invierno, que en algunos lagartos reduce los niveles de proliferación celular (Peñafiel *et al.*, 2001). Aunque es posible también que la corticosterona no inhiba la proliferación celular en los lagartos, y que la simultaneidad del pico estival de corticosterona y el descenso en la proliferación celular en verano sea meramente accidental y no causal.

5.4.4 Estacionalidad en áreas quimiosensoriales y en la quimiorrecepción

En algunos animales se ha observado que la quimiorrecepción varía estacionalmente, y a menudo, estos cambios estacionales ocurren asociados a cambios estructurales en las áreas quimiosensoriales. Por ejemplo, en los peces de la especie *Carassius carassius*, la densidad de células criptales situadas en la superficie del epitelio olfativo aumenta en verano, lo que supuestamente contribuye a aumentar la sensibilidad a determinados estímulos químicos (Hamdani *et al.*, 2008). En las salamandras pletodóntidas,

la adición de neuronas en el órgano vomeronasal aumenta al final de la primavera (Dawley *et al.*, 2000, 2006). Como consecuencia el órgano vomeronasal crece, permitiendo una mayor exploración quimiosensorial en verano relacionada con un incremento en el forrajeo y la territorialidad (Dawley & Crowder, 1995; Dawley *et al.*, 2000, 2006). La quimiorrecepción también varía estacionalmente en los lagartos. Por ejemplo, la producción y la composición de las marcas olorosas en algunos lagartos varía con la estación y los niveles de esteroides sexuales (Mason *et al.*, 1987; Alberts *et al.*, 1992a,b). Algunos lagartos además depositan más marcas oloras durante la estación reproductiva que el resto del año (Martins *et al.*, 2006). También varía estacionalmente en los lagartos la respuesta a determinados olores (Carazo *et al.*, 2007). Por otra parte, el tamaño del espacio doméstico y el número de interacciones agonísticas con conespecíficos aumentan en la estación reproductiva, principalmente en los machos (Aragón *et al.*, 2001). Dado que los lagartos utilizan los estímulos químicos para el reconocimiento de conespecíficos, la discriminación de estatus social y sexual y en algunos casos el reconocimiento individual, muy probablemente la dependencia en la quimiorrecepción aumenta también en la estación reproductiva (Burghardt, 1970; Mason, 1992; Halpern, 1992; Font, 1996; Pianka & Vitt, 2003; Carazo *et al.* 2007, 2008, 2011; Wyatt, 2014). Para satisfacer esta mayor dependencia en la quimiorrecepción durante la estación reproductiva, los lagartos, como *P. liolepis*, podrían requerir de áreas quimiosensoriales más grandes y/o una mayor adición de neuronas en estas áreas.

**Migración de las nuevas células
en el telencéfalo de *P. liolepis*:
Influencia del sexo y la
estacionalidad**

cap. **6**

6.1 Introducción

La mayoría de las neuronas que se generan en el cerebro adulto no se incorporan en el mismo lugar de nacimiento, sino que migran a través del parénquima hasta alcanzar su lugar de destino. Por ejemplo, muchas de las neuronas que se incorporan al cerebelo en los peces eléctricos adultos se originan en las capas moleculares del corpus y la válvula, desde donde migran a las capas granulares (Zupanc *et al.*, 1996). Las neuronas que se incorporan al telencéfalo en las aves adultas se originan en la zona ventricular, desde donde migran al parénquima de distintas áreas telencefálicas (Goldman & Nottebohm, 1983; Álvarez-Buylla *et al.*, 1990). En el giro dentado del hipocampo de los roedores, las neuronas nacen en la zona subgranular, desde donde migran a la capa granular (Altman & Bayer, 1990; Kuhn *et al.*, 1996). Por último, las neuronas que se incorporan a los bulbos olfativos de roedores y primates nacen en la zona subventricular de los ventrículos laterales, y migran tangencialmente a los bulbos olfativos formando largas cadenas que constituyen el torrente migratorio rostral (*rostral migratory stream*, RMS; Altman, 1969; Kaplan & Hinds, 1977; Corotto *et al.*, 1993; Lois & Alvarez-Buylla, 1994; Kornack & Rakic, 2001; Bédard & Parent, 2004). Como en la neurogénesis embrionaria, las células gliales guían a menudo las nuevas células durante su migración en el cerebro adulto. Las nuevas células que migran radialmente en peces y aves siguen el andamiaje que forman los tallos de la glía radial, que aún perdura del desarrollo embrionario (Zupanc *et al.*, 1996; Álvarez-Buylla, 1990). En los mamíferos, la glía radial embrionaria

desaparece y se transforma en astrocitos (Voigt, 1989; Chanas-Sacre *et al.*, 2000). Astrocitos radiales guían la migración radial de las nuevas células en el giro dentado (Seri *et al.*, 2004), mientras que en el RMS, los astrocitos se agrupan formando gliotubos que envuelven las cadenas de nuevas células en migración tangencial hacia los bulbos olfativos (Lois *et al.*, 1996).

En los lagartos adultos, las nuevas neuronas se originan principalmente en la zona ventricular, desde donde migran a distintas áreas telencefálicas. En la mayoría de áreas telencefálicas, las células migran radialmente cortas distancias hasta su lugar de destino. Por ejemplo, en el córtex medial, las nuevas células se generan en la zona ventricular, desde donde migran radialmente a capas superiores siguiendo los tallos de la glía radial, como en la neurogénesis embrionaria (Goffinet, 1983; García-Verdugo *et al.*, 1986; Font *et al.*, 2001). El córtex medial tiene una estructura trilaminar, formada por una capa central densamente poblada de neuronas granulares (el estrato de somas), rodeada por dos capas pobres en células (las capas plexiformes interna y externa; Ulinski, 1990; Fig. 6.1).

En *P. liolepis* se ha estudiado con detalle la migración radial de los neuroblastos desde su origen en la zona ventricular a su destino en el estrato de somas del córtex medial (López-García *et al.*, 1990a). Un día tras la administración de un marcador de proliferación celular, no se encuentran células marcadas fuera de la zona ventricular. Con tiempos de supervivencia entre una y tres semanas, muchas células fusiformes marcadas, supuestamente neuroblastos en migración, pueden encontrarse atravesando

la capa plexiforme interna. A tiempos más largos de supervivencia, las células marcadas se diferencian en neuronas y se alejan progresivamente de la zona ventricular (Ramírez-Castillejo *et al.*, 2002). A partir de un mes tras la inyección de BrdU, la mayoría de las células marcadas se encuentran en el estrato de somas, integradas en los circuitos neuronales, donde son morfológicamente indistinguibles de las neuronas que les rodean (López-García *et al.*, 1990a,b; Font *et al.*, 2001; Fig. 6.1).

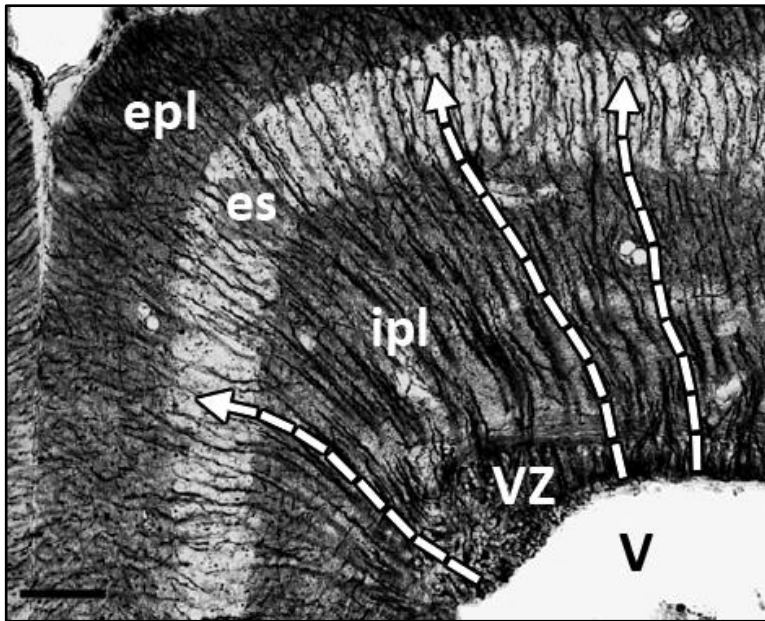


Figura 6.1 Fotomicrografía del córtex medial de un lagarto (*Tarentola mauritanica*) marcado con anti-GFAP. Las flechas indican la dirección de migración de las células BrdU+ desde la zona ventricular (VZ) a través de la capa plexiforme interna (ipl) al estrato de somas (es). V, ventrículo; epl, capa plexiforme externa. Modificada a partir de Font *et al.*, 2001.

Las nuevas neuronas que se incorporan a los bulbos olfativos en los lagartos no se producen *in situ* como en el córtex medial, sino que se generan en la zona ventricular de la región retrobulbar del telencéfalo, desde donde migran a los bulbos olfativos (García-Verdugo *et al.*, 1989, 2002). En la lagartija colilarga (*Psammmodromus algirus*) se ha estudiado con detalle esta migración tangencial (Peñafiel *et al.*, 1996). Pocas horas tras la inyección de un marcador de proliferación celular, la mayoría de las células marcadas se hallaron en la zona ventricular de la región retrobulbar. Quince días tras la inyección del marcador, seguía habiendo células marcadas en la región retrobulbar, pero también se hallaron muchas células marcadas en el pedúnculo olfativo, y algunas en los bulbos olfativos. Las células marcadas en el pedúnculo olfativo eran fusiformes y tenían el núcleo orientado paralelo a la región ventricular. A los 33 días, la mayoría de las células marcadas se hallaron diferenciadas en neuronas granulares en los bulbos olfativos principal y accesorio, lo que sugiere que en *P. algirus* se requiere al menos un mes para que la mayoría de las células marcadas migren hasta alcanzar los bulbos olfativos y se integren en circuitos neuronales (Peñafiel *et al.*, 1996).

En lagartos de la especie *Tarentola mauritanica* se ha observado que poco tiempo tras la inyección de un marcador de proliferación celular, una gran cantidad de células marcadas se encuentran en la zona ventricular del sulcus ventralis/terminalis de los ventrículos laterales (i.e. el epéndimo ventromedial). Sin embargo, transcurrido un mes desde la inyección del marcador, muy pocas células se observan en la zona ventricular del sulcus o en la porción del estriado que lo rodea, lo que sugiere que estas células

mueren o migran largas distancias. Dado que no se ha descrito muerte celular en el telencéfalo de los lagartos (López-García *et al.*, 1990a; Font *et al.*, 1995, 1997), es probable que muchas de las células que se generan en el sulcus ventralis / terminalis migren también hasta los bulbos olfativos (Pérez-Cañellas & García-Verdugo, 1996).

Se ha sugerido que la migración de las neuronas en el telencéfalo podría estar regulada por algunos factores como la temperatura ambiental, que en animales poiquiloterms como los lagartos influiría en la temperatura corporal. Estudios previos que han manipulado la temperatura ambiental en el laboratorio han señalado que las bajas temperaturas ralentizan e incluso inhiben la migración de las nuevas células a sus lugares de destino en los lagartos. Por ejemplo, el mantenimiento de lagartos de la especie *Podarcis hispanica* a 10 °C ralentizó la migración de los neuroblastos en el córtex medial (Ramírez *et al.*, 1997). Las bajas temperaturas (10 °C) inhibieron la migración de los neuroblastos en varias áreas telencefálicas de los lagartos de la especie *Psammodromus algirus* (Peñafiel *et al.*, 2001). También las bajas temperaturas (16 °C) ralentizaron la migración de los neuroblastos en la corteza de lagartos de la especie *Tropidurus hispidus* (Marchioro *et al.*, 2012).

6.2 Objetivos

En ausencia de muerte celular, la cantidad de células BrdU+ que hallamos en una determinada área cerebral es el resultado de la producción de nuevas células en las zonas germinales y la migración de estas células hacia

sus lugares de destino en este área. Tres semanas tras la administración de BrdU, esperaríamos encontrar más células BrdU+ alejadas de la zona ventricular en el sexo y los periodos del año en los que la proliferación celular en las zonas germinales del telencéfalo es más alta, ya que cuantas más células se produzcan, más podrán migrar. También esperaríamos hallar más células BrdU+ fuera de la zona ventricular en el sexo y los periodos del año en los que se estimule la migración de las nuevas células a sus lugares de destino, ya sea porque las nuevas células inician antes su migración, porque migran más deprisa a través del parénquima, o porque una mayor proporción de nuevas células se incorporen a circuitos alejados de la zona ventricular. El objetivo principal de este capítulo es conocer si existe estacionalidad en la tasa de migración de las nuevas células generadas en la zona ventricular del telencéfalo de *P. liolepis*. Esta tasa de migración se refiere a la cantidad de nuevas células que migran a sus lugares de destino con respecto al total de nuevas células generadas en la zona ventricular. En este capítulo analizamos la tasa de migración de las nuevas células en los dos sexos y en distintas épocas de captura en dos regiones cerebrales:

- 1) el córtex medial, en el que estudiamos la tasa de migración radial de las nuevas células desde la zona ventricular al parénquima.
- 2) el torrente migratorio rostral (RMS), en el que estudiamos la tasa de migración tangencial de las nuevas células desde la zona ventricular de la región retrobulbar y el sulcus ventralis/terminalis a los bulbos olfativos.

6.3 Resultados

6.3.1 Sexo y estacionalidad en la tasa de migración radial de las nuevas células en el córtex medial

Tres semanas tras la administración de BrdU, hallamos muchas células BrdU+ que habían migrado desde la zona ventricular a la capa plexiforme interna y el estrato de somas en el parénquima del córtex medial de *P. liolepis* (Fig. 6.2a). Estas células BrdU+ en el parénquima eran aproximadamente la mitad de las generadas en junio-julio y agosto-septiembre, mientras que en otras épocas de captura, como en enero-febrero, apenas alcanzaban el 12% de las generadas (Fig. 6.2a). En abril-mayo y noviembre-diciembre observamos más células BrdU+ en el parénquima del córtex medial en términos absolutos que en agosto-septiembre, pero éstas representaban una proporción mucho menor en relación a las que se habían producido en la zona ventricular (Figs. 6.2a y b). Para examinar la variación sexual y estacional en la tasa de migración de nuevas células en el córtex medial utilizamos un ANCOVA cruzado de dos factores (sexo y época de captura). En este ANCOVA utilizamos la cantidad de células BrdU+ por hemisección en el parénquima del córtex medial como variable y la cantidad de células BrdU+ por hemisección en la zona ventricular del córtex medial como covariable. Este ANCOVA no reveló diferencias entre sexos, pero sí estacionalidad en la tasa de migración de nuevas células en el córtex medial: la cantidad de células BrdU+ migradas al parénquima en tres semanas con respecto al resto en el córtex medial es mayor en agosto–septiembre y en junio–julio que el resto del año (Tabla 6.1).

Figura 6.2 A) Recuentos totales (media \pm SEM) a lo largo de un año de células BrdU+ en la zona ventricular y el parénquima del córtex medial. Medias calculadas agrupando machos y hembras. B) Diferencia en estos recuentos (parénquima – VZ). es, estrato de somas; ipl, capa plexiforme interna; VZ, zona ventricular.

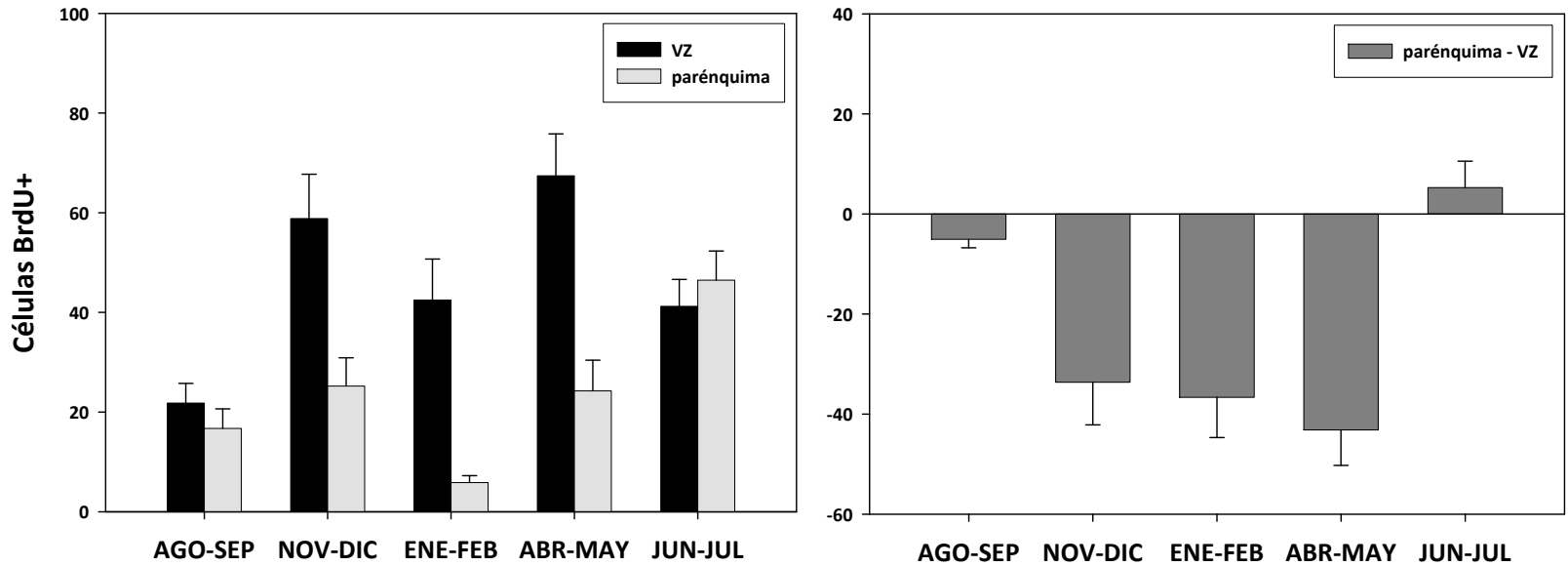


Tabla 6.1 Variación sexual y estacional en la cantidad de células BrdU+ por hemisección en el parénquima del córtex medial. Resultados del ANCOVA con la cantidad de células BrdU+ por hemisección en la zona ventricular como covariable.

	SEXO			ESTACIÓN		
	<i>F</i>	<i>p</i>	♂, ♀	<i>F</i>	<i>p</i>	Máximos
MC	$F_{1,86} = 1,30$	<i>ns</i>	♂ ≈ ♀	$F_{4,86} = 22,2$	$p < 0,001$	ago-sep, jun-jul

6.3.2 Sexo y estacionalidad en la tasa de migración tangencial de las nuevas células a los bulbos olfativos

Tres semanas tras la administración de BrdU, hallamos muchas células BrdU+ en las áreas telencefálicas implicadas en el torrente migratorio rostral (RMS): bulbos olfativos principal y accesorio, pedúnculo olfativo, epéndimo retrobulbar y epéndimo ventromedial (Fig. 6.3a). En enero–febrero, la mayoría de las células BrdU+ se acumulaban en la zona ventricular de la región retrobulbar y en el epéndimo ventromedial, y eran escasas en el bulbo olfativo principal, el área cerebral más alejada de estos epéndimos. En cambio, en agosto–septiembre y en junio–julio, una gran cantidad de células BrdU+ habían alcanzado ya el bulbo olfativo principal con respecto a la generadas (Figs. 6.3 y 6.4).

Figura 6.3 A) Recuentos totales (media \pm SEM) a lo largo de un año de células BrdU+ por áreas en el RMS tres semanas tras la inyección de BrdU. Medias calculadas agrupando machos y hembras. B) Diferencia entre recuentos. AOB, bulbo olfativo accesorio; MOB, bulbo olfativo principal; Retrob+EpVm, región retrobulbar y epéndimo ventromedial (epéndimo del sulcus ventralis /terminalis).

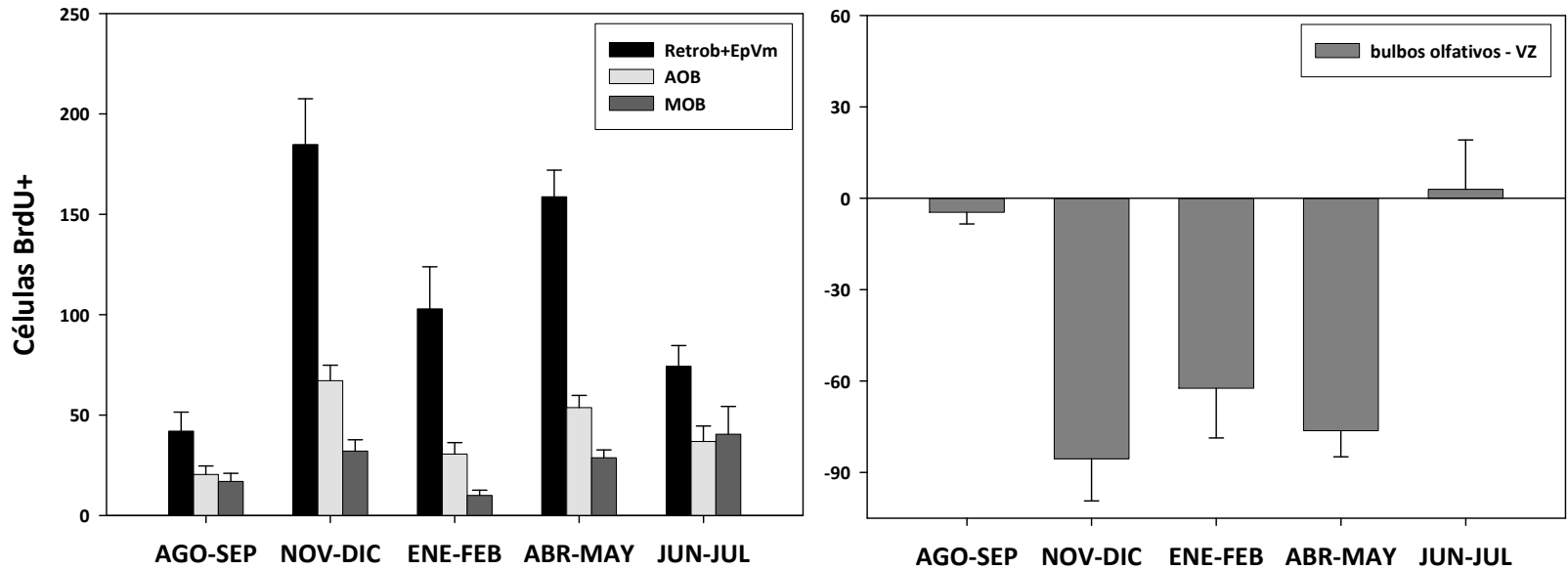
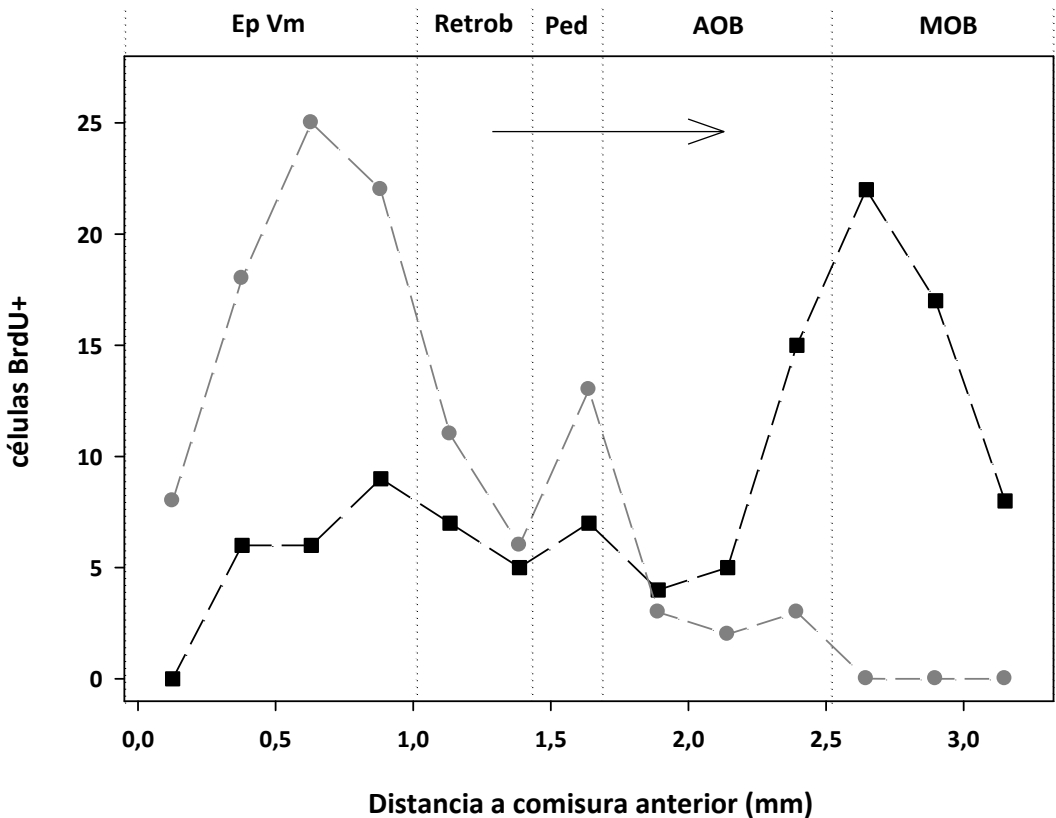


Figura 6.4 Distribución de células BrdU+ en el torrente migratorio rostral de *P. liolepis* tres semanas tras la inyección de BrdU. Cada punto en las rectas representa la suma de células BrdU+ en tres cortes consecutivos en los que contamos células marcadas. La flecha marca el sentido del desplazamiento de las células BrdU+ a lo largo del torrente. Círculos grises, recuentos en el ejemplar 655 (ene-feb); cuadrados negros, recuentos en el ejemplar 693 (jun-jul). Ambos ejemplares son hembras, tienen cerebros de tamaño similar y el mismo número de células BrdU+ en el torrente (111).



Los ANCOVA mostraron que la tasa de migración de nuevas células a los bulbos olfativos varía estacionalmente: la cantidad de células BrdU+ que alcanza los bulbos olfativos en tres semanas con respecto al total de células BrdU+ generadas en el RMS es mayor en agosto–septiembre y en junio–julio que el resto del año (Tabla 6.2). Los ANCOVA no hallaron diferencias sexuales en la cantidad de células BrdU+ que migran a los bulbos olfativos con respecto al total de células BrdU+ generadas en el RMS (Tabla 6.2).

Tabla 6.2 Variación sexual y estacional en la cantidad de células BrdU+ en los bulbos olfativos de *P. liolepis* tres semanas tras la inyección de BrdU. Resultados del ANCOVA utilizando los recuentos de células BrdU+ en el resto del RMS como covariable.

	SEXO			ESTACIÓN		
	<i>F</i>	<i>p</i>	♂, ♀	<i>F</i>	<i>p</i>	Máximos
MOB	$F_{1,81} = 0,01$	<i>ns</i>	♂ ≈ ♀	$F_{4,81} = 10,6$	$p < 0,001$	ago-sep, jun-jul
AOB	$F_{1,81} = 0,01$	<i>ns</i>	♂ ≈ ♀	$F_{4,81} = 4,3$	$p < 0,01$	jun-jul

6.3.3 Resumen de los principales resultados

- 1) La cantidad de nuevas células que migran con respecto a las generadas en la zona ventricular no difiere entre los sexos en el córtex medial y el RMS (Tablas 6.1 y 6.2).

2) Tres semanas tras la administración de BrdU, la cantidad de nuevas células que ha migrado al parénquima del córtex medial o a los bulbos olfativos desde la zona ventricular con respecto a las generadas es mayor en verano que el resto del año (Figs. 6.2, 6.3 y 6.4; Tabla 6.2).

6.4 Discusión

6.4.1 Sexo y estacionalidad en la tasa de migración de las nuevas células

No hallamos diferencias sexuales en la tasa de migración de nuevas células en el córtex medial y a los bulbos olfativos; sin embargo, sí hallamos una clara estacionalidad. En el córtex medial, tres semanas tras la administración de BrdU, más células BrdU+ alcanzaron la capa plexiforme interna y el estrato de somas con respecto a las generadas en la zona ventricular en junio–julio y agosto–septiembre que el resto del año (Tabla 6.1). En el RMS, tres semanas fueron suficientes para que gran cantidad de células BrdU+, generadas en la zona ventricular de la región retrobulbar y del sulcus ventralis / terminalis, alcanzaran los bulbos olfativos principal y accesorio. El bulbo olfativo principal es el área más alejada de las zonas germinales, y es donde mejor se observa la estacionalidad en la tasa de migración tangencial de nuevas células. La cantidad de células BrdU+ que alcanzan el bulbo olfativo principal con respecto al resto de células generadas en el RMS es mayor en agosto–septiembre y junio–julio que el resto del año (Tabla 6.2).

Que en el córtex medial y el RMS una mayor cantidad de células BrdU+ se hayan encontrado fuera de la zona ventricular en estas épocas podría sugerir que la migración de las nuevas células a sus lugares de destino se acelera durante el verano. Las nuevas células alcanzarían más rápidamente su lugar de destino por mecanismos que de momento desconocemos. Recientemente se ha descrito estacionalidad en la migración de nuevas células hacia los bulbos olfativos en el lagarto tizón (*Gallotia galloti*, Delgado-González *et al.*, 2011). Para estudiar la estacionalidad en la migración, Delgado-González y colaboradores compararon la cantidad de células BrdU+ en el parénquima de los bulbos olfativos y el núcleo olfativo anterior un mes tras la inyección de BrdU. Encontraron menos células BrdU+ en el parénquima de los bulbos olfativos en verano que el resto del año, por lo que dedujeron que la migración a los bulbos olfativos se ralentizaba durante el verano (Delgado-González *et al.*, 2011). La discrepancia entre los resultados obtenidos en *G. galloti* y *P. liolepis* quizás radica en que el estudio con *G. galloti* no tiene en cuenta la estacionalidad en la proliferación celular en el telencéfalo para estudiar la variación estacional en la migración a los bulbos olfativos. La proliferación celular en la región retrobulbar en *G. galloti* es menor en verano que el resto del año (Delgado-González *et al.*, 2011), por lo que una menor cantidad de células BrdU+ podrán migrar a los bulbos olfativos. Si bien es cierto que una menor cantidad de células BrdU+ alcanzaron los bulbos olfativos en verano, éstas representaban una proporción considerable de las que se habían generado en la región retrobulbar. De hecho, la cantidad de células que habían alcanzado el bulbo

olfativo con respecto a las producidas en la región retrobulbar era mayor en verano que el resto del año, un resultado que coincide con el obtenido en este estudio con *P. liolepis*. Es posible, por tanto, que la migración a los bulbos olfativos en *G. galloti* se acelere durante el verano al igual que ocurre en *P. liolepis*.

6.4.2 Temperatura ambiental y la tasa de migración de las nuevas células

Que las células BrdU+ alcancen antes su lugar de destino en verano que en invierno podría sugerir que la temperatura ambiental afecta a la migración de las nuevas células en el telencéfalo de *P. liolepis*, como han sugerido los resultados de estudios experimentales en el laboratorio. El mantenimiento a bajas temperaturas en el laboratorio ralentiza e incluso inhibe la migración de los neuroblastos en el córtex medial y en el RMS de algunos lagartos (Ramírez *et al.*, 1997; Peñafiel *et al.*, 2001; Marchioro *et al.*, 2012). De forma análoga, es posible que el descenso invernal de las temperaturas ralentice la migración de las nuevas células en el telencéfalo de *P. liolepis*, de manera que tres semanas tras la inyección de BrdU, la mayoría de estas células seguirían aún en la zona ventricular en invierno. El aumento estival de las temperaturas, en cambio, aceleraría la migración de las nuevas células, y tres semanas tras la administración de BrdU, muchas de ellas habrían alcanzado ya su lugar de destino. La principal objeción a esta hipótesis es que desconocemos cómo la temperatura ambiental afecta a la temperatura del cerebro en *P. liolepis*.

A través de los Capítulos 4, 5 y 6 de esta tesis hemos mostrado cómo un mismo factor (e.g. la estacionalidad) produce distintos efectos sobre las distintas fases del proceso de neurogénesis adulta en *P. liolepis* (e.g. los niveles de proliferación aumentan en primavera y otoño, mientras que la tasa de migración aumenta en verano). Estos resultados ponen de manifiesto la complejidad de la regulación de la neurogénesis adulta en los reptiles, y la importancia de estudiar la regulación de todas las fases de la neurogénesis adulta (proliferación, migración, diferenciación y supervivencia de las nuevas células) para conocer cómo un factor actúa sobre los niveles de neurogénesis adulta (Kempermann, 2011).

Sección IV

Conclusiones finales

**Discusión general
y Conclusiones**

cap. 7

7.1 Discusión general

Uno de los pilares en los que se apoya la creencia de que la neurogénesis adulta es mucho más que un remanente afuncional de la neurogénesis embrionaria, es que la neurogénesis adulta es regulada por muchos factores (Kempermann *et al.*, 2011). Estos factores se han identificado principalmente a partir de la investigación con aves y mamíferos, y generalmente en condiciones de laboratorio, mientras que los estudios con otros vertebrados son mucho más escasos, especialmente en condiciones naturales. Esta tesis nos ha permitido identificar dos factores que regulan la neurogénesis adulta en un reptil en condiciones semi-naturales: el sexo y la estacionalidad. Estos factores regulan también el tamaño del cerebro y el tamaño de los bulbos olfativos. Su regulación por varios factores sugiere que la neurogénesis adulta en los reptiles podría tener un valor adaptativo. Este valor adaptativo podría estar relacionado con la capacidad de regeneración en caso de lesión (Font *et al.*, 1991). Sin embargo, y como sugieren los resultados obtenidos en varios grupos de vertebrados, es posible también que la neurogénesis en los reptiles, además de permitir la regeneración del cerebro, contribuya a la adaptación al medio (Kempermann, 2002, 2006; Petreanu & Álvarez-Buylla, 2002; Lledo & Gheusi, 2003; Lemasson *et al.*, 2005).

El cerebro, los bulbos olfativos y la neurogénesis adulta en *P. liolepis* son sexualmente dimórficos. Los machos adultos tienen cerebros y bulbos olfativos accesorios más grandes que las hembras, y áreas telencefálicas como el córtex medial y las áreas quimiosensoriales producen más células en los

machos que en las hembras. En el hipocampo de los roedores, el aprendizaje y la memoria espacial mejoran cuando el hipocampo crece e incorpora más neuronas, lo que sugiere que el crecimiento y la neurogénesis adulta contribuyen positivamente a las habilidades espaciales (Ehninger & Kempermann, 2007). También un mayor reclutamiento de nuevas neuronas en el bulbo olfativo se asocia a una mejora en la memoria olfativa (Rocheffort *et al.*, 2002). De forma similar, los machos de *P. liolepis* con áreas espaciales y quimiosensoriales más grandes y que incorporan más neuronas deberían mostrar mayores habilidades espaciales y quimiosensoriales, o una mayor dependencia del comportamiento espacial o quimiosensorial que las hembras. Aunque son escasos, algunos estudios han descrito diferencias sexuales que favorecen a los machos del género *Podarcis* en el comportamiento espacial (e.g. espacios domésticos más grandes; Gil *et al.*, 1988) y quimiosensorial (e.g. Barbosa *et al.*, 2006), y que apoyarían la hipótesis de que un cerebro más grande y que incorpora más neuronas en los machos de *P. liolepis* se podría corresponder con mayores habilidades espaciales o quimiosensoriales.

El cerebro, los bulbos olfativos y la neurogénesis adulta en *P. liolepis* varían estacionalmente. El cerebro y los bulbos olfativos principales son más grandes en primavera, y el telencéfalo produce más células en primavera y otoño que en verano e invierno. Por regla general, las áreas cerebrales crecen e incorporan más neuronas en la estación del año en que los animales dependen en mayor medida del comportamiento o las modalidades sensoriales que estas áreas controlan. Esta estación suele ser la estación

reproductiva (véase ejemplos en las Tablas 2.3 y 2.5). El cerebro de *P. liolepis* es más grande y produce más células en primavera, coincidiendo con la activación de la reproducción. En esta estación, *P. liolepis* depende más de la quimiorrecepción y sus habilidades espaciales para la búsqueda y el reconocimiento de conespecíficos, la discriminación del estatus social y sexual, e incluso para el reconocimiento individual (Font & Desfilis, 2002; López & Martín, 2002, 2005; Carazo *et al.*, 2007, 2008, 2011). En los roedores se ha sugerido que la neurogénesis adulta es necesaria para modelar el procesamiento de información sensorial en el bulbo olfativo (Gheusi *et al.*, 2000; Cecchi *et al.*, 2001; Lemasson *et al.*, 2005). Las nuevas neuronas granulares participarían en la codificación de la información olfativa afinando la capacidad de discriminar y reconocer olores (*refinement of odor-molecule tuning*; Gheusi *et al.*, 2000; Enwere *et al.*, 2004; Belnoue *et al.*, 2011). Si la incorporación de nuevas neuronas favorece la capacidad de reconocer y discriminar olores en *P. liolepis*, deberían observarse mayores niveles de neurogénesis en la estación reproductiva, cuando más esencial es la discriminación y el reconocimiento de olores de conespecíficos.

La proliferación celular en el telencéfalo de *P. liolepis* alcanza en otoño valores similares a los observados en primavera. Este pico en proliferación celular no puede relacionarse con la reproducción, ya que *P. liolepis* se encuentra reproductivamente inactiva, como indica la presencia de testículos no espermiogénicos y bajos niveles de testosterona en los machos, y la ausencia de folículos vitelogénicos en las hembras (Pérez-Mellado, 1982; Andò *et al.*, 1990, 1992; Moore & Lindzey, 1992; Whittier & Tokarz, 1992). En

algunos vertebrados se ha descrito crecimiento del cerebro y altos niveles de neurogénesis asociados a comportamientos no reproductivos, por ejemplo, en algunas aves se asocian al almacenamiento de alimento en otoño (Barnea & Nottebohm, 1994; Smulders *et al.*, 1995). *P. liolepis* depende de la quimiorrecepción también en otoño para explorar el ambiente, y detectar presas y depredadores (Gómez *et al.*, 1993; Van Damme & Castilla, 1996; Desfilis *et al.*, 2003). El aumento en la proliferación celular en las áreas quimiosensoriales de *P. liolepis* en el otoño podría estar asociado a una mayor actividad quimiosensorial relacionada con una mayor exploración del entorno o forrajeo en esta estación (Desfilis, comunicación personal).

Los niveles de testosterona y corticosterona varían estacionalmente en los machos de *P. liolepis*. Los niveles de testosterona aumentan al inicio de la primavera, y los de corticosterona al inicio del verano. El aumento de los niveles de testosterona al inicio de la primavera coincide temporalmente con un cerebro más grande y el aumento en los niveles de proliferación celular en el telencéfalo de *P. liolepis*, mientras que el aumento en los niveles de corticosterona coincide temporalmente con la caída en los niveles de proliferación celular al inicio del verano. Esto podría sugerir que la testosterona estimula la proliferación celular en el telencéfalo de *P. liolepis* al inicio de la primavera, mientras que la corticosterona la inhibe al inicio del verano. Sin embargo, los niveles de proliferación vuelven a aumentar en otoño y caen posteriormente en invierno, mientras que los niveles de testosterona y corticosterona se mantienen bajos, lo que sugiere que el pico de proliferación celular en otoño y su posterior caída en invierno se producen

independientemente de la regulación de estas hormonas. Futuros estudios en los que se manipulen experimentalmente los niveles de testosterona y corticosterona en *P. liolepis* (por ejemplo, mediante implantes con estas hormonas) son necesarios para aclarar si la neurogénesis adulta responde o no a la regulación hormonal en *P. liolepis*. Si se confirma que estas hormonas regulan los niveles de neurogénesis adulta en *P. liolepis*, el siguiente paso será investigar qué otros factores estimulan la neurogénesis en otoño cuando los niveles de estas hormonas son bajos.

Nuevas líneas de investigación

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis se abren nuevas vías para la investigación en la neurogénesis adulta en los lagartos y, en general, en los reptiles. Hemos sugerido que las diferencias sexuales y estacionales en los niveles de proliferación celular en áreas espaciales y quimiosensoriales en *P. liolepis* podrían estar asociadas a diferencias en las habilidades espaciales y quimiosensoriales. Esta afirmación se basa en dos tipos de estudios realizados principalmente en el hipocampo y el bulbo olfativo de aves y mamíferos: 1) estudios comparativos, en los que se comparan las habilidades espaciales y quimiosensoriales de grupos de animales que difieren en los niveles de neurogénesis adulta en el hipocampo y el bulbo olfativo (e.g. Amrein *et al.*, 2004; Hoshooley & Sherry, 2007; Kaslin *et al.*, 2008); 2) estudios que manipulan experimentalmente los niveles de neurogénesis adulta en el hipocampo y el bulbo olfativo, y analizan cómo esta manipulación afecta a las

habilidades espaciales y quimiosensoriales (e.g. Gheusi *et al.*, 2000; Shors & Gould, 2001). Por regla general, estos estudios han puesto de manifiesto que mayores niveles de neurogénesis adulta en el hipocampo y el bulbo olfativo se corresponden con mayores habilidades espaciales y quimiosensoriales. Estas mayores habilidades se manifiestan de muy distintas maneras, como una mejora en el aprendizaje espacial (Gould *et al.*, 1999; van Praag *et al.*, 1999a; Amrein *et al.*, 2004), una memoria más precisa para localizar objetos (Hoshooley & Sherry, 2007; Sherry & Hoshooley, 2009), o una mayor capacidad para discriminar olores (Gheusi *et al.*, 2000; Enwere *et al.*, 2004). Por el momento, estudios similares no se han realizado en reptiles, y contribuirían a entender cómo los niveles de neurogénesis adulta afectan a distintos comportamientos o capacidades sensoriales y cognitivas en este grupo.

Numerosos estudios han demostrado que existe una relación entre la novedad y la complejidad del medio y los niveles de neurogénesis adulta en áreas espaciales y quimiosensoriales. La exposición a medios ricos en estímulos (e.g. visuales, quimiosensoriales, sociales) estimula la neurogénesis adulta (Kempermann *et al.*, 1997; van Praag *et al.*, 2000; Rochefort *et al.*, 2002; Martončíková *et al.*, 2011); mientras que la ausencia o escasez de percepción de nuevos estímulos se asocia a bajos niveles de neurogénesis adulta (por ejemplo, en animales en los que se han bloqueado los órganos sensoriales [e.g. Corotto *et al.*, 1994] y en animales mantenidos en medios empobrecidos durante periodos prolongados [e.g. Barnea & Nottebohm, 1994; Delgado-González *et al.*, 2008; Dunlap *et al.*, 2011]). La evidencia

disponible en los reptiles es escasa, pero apunta en la misma dirección: los lagartos machos de la especie *Uta stansburiana* mantenidos en grandes recintos tienen niveles más altos de neurogénesis adulta que lagartos mantenidos en recintos más pequeños, lo que sugiere que los niveles de neurogénesis se ajustan a las características del medio también en los reptiles (LaDage *et al.*, 2013). Se requieren más estudios que profundicen en la relación existente entre la complejidad del medio y los niveles de neurogénesis adulta en los reptiles, y que ayuden a dilucidar, por ejemplo, cómo una mayor exposición a olores de conoespecíficos en la estación reproductiva contribuye a estimular la neurogénesis adulta en áreas quimiosensoriales en *P. liolepis*.

7.2 Conclusiones

El objetivo principal de esta tesis es identificar factores que regulan el tamaño del cerebro y la neurogénesis adulta en los reptiles. Para ello estudiamos cómo el sexo, la estacionalidad y las hormonas esteroides afectan al tamaño del cerebro, el tamaño de los bulbos olfativos y la proliferación celular y la migración de las nuevas células en el telencéfalo de *P. liolepis* (Capítulo 1). En resumen, las conclusiones de esta tesis son:

1. Los machos de *P. liolepis* adultos tienen cerebros más grandes en términos absolutos y relativos que las hembras (Capítulo 4).

2. Los bulbos olfativos de los machos de *P. liolepis* son más grandes que los de las hembras: el bulbo olfativo principal en términos absolutos y el bulbo olfativo accesorio tanto en términos absolutos como en relación al tamaño del cerebro (Capítulo 4).

3. Los machos de *P. liolepis* adultos producen más células en el telencéfalo que las hembras, controlando estadísticamente las diferencias en tamaño corporal y del cerebro ligadas al sexo. Esta diferencia en proliferación celular se observó también cuando estudiamos el córtex medial y las áreas quimiosensoriales por separado (Capítulo 4).

4. El cerebro y los bulbos olfativos principales de *P. liolepis* son más grandes en primavera (Capítulo 5).

5. Los niveles de proliferación celular en el telencéfalo de *P. liolepis*, son más altos en primavera y otoño que en invierno y verano (Capítulo 5).

6. En los machos de *P. liolepis*, los niveles de testosterona aumentan al inicio de la primavera, y los de corticosterona al inicio del verano (Capítulo 5).

7. La presencia de áreas espaciales y quimiosensoriales más grandes y que producen más células en los machos de *P. liolepis* podría relacionarse con mayores habilidades espaciales y quimiosensoriales, o una mayor dependencia de estas habilidades (Capítulo 4). Las áreas espaciales y quimiosensoriales producen más células en primavera y otoño, cuando la dependencia de las habilidades espaciales y quimiosensoriales es más alta para la exploración del entorno, la detección de presas y depredadores y en contextos sociales (Capítulo 5).

8. La tasa de migración de nuevas células a sus lugares de destino no difiere entre los sexos, y es más alta en verano que en el resto del año. El aumento estival de las temperaturas podría influir en la migración de las nuevas células (Capítulo 6).

9. El sexo y la estacionalidad producen distintos efectos sobre distintas fases del proceso de neurogénesis adulta en *P. liolepis* (e.g. los niveles de proliferación aumentan en primavera y otoño, mientras que la tasa de migración aumenta en verano; Capítulos 4, 5 y 6). Estos resultados ponen de manifiesto la complejidad de la regulación de la neurogénesis adulta en los reptiles, y la importancia de estudiar la regulación en distintas fases de la neurogénesis adulta (proliferación, migración, diferenciación y supervivencia de las nuevas células).

Sección V

Referencias

- Absil P, Pinxten R, Balthazart J, Eens M (2003) Effects of age and testosterone on autumnal neurogenesis in male European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Behav Brain Res* 143:15-30.
- Adkins-Regan E, Mansukhani V, Seiwert C, Thompson R (1994) Sexual differentiation of brain and behavior in the zebra finch: critical periods for effects of early estrogen treatment. *J Neurobiol* 25:865-877.
- Aiello LC, Wheeler P (1995) The expensive-tissue hypothesis: the brain and the digestive system in human and primate evolution. *Curr Anthropol* 36:199-221.
- Alberts AC, Pratt NC, Phillips JA (1992a) Seasonal productivity of lizard femoral glands: relationship to social dominance and androgen levels. *Physiol Behav* 51:729-733.
- Alberts AC, Sharp TR, Werner DI, Weldon PJ (1992b) Seasonal variation of lipids in femoral gland secretions of male green iguanas (*Iguana iguana*). *J Chem Ecol* 18:703-712.
- Altman J (1962) Are new neurons formed in the brain of adult mammals? *Science* 135:-1127.
- Altman J, Das GD (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319-336.
- Altman J (1969) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 137:433-458.
- Altman J, Bayer SA (1990) Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J Comp Neurol* 301:365-381.
- Alvarez-Buylla A, Theelen M, Nottebohm F (1990) Proliferation 'hot spots' in adult avian ventricular zone reveal radial cell division. *Neuron* 5:101-109.
- Alvarez-Buylla A, Ling C-Y, Yu WS (1994) Contribution of neurons born during embryonic, juvenile, and adult life to the brain of adult canaries: regional specificity and delayed birth of neurons in the song-control nuclei. *J Comp Neurol* 347:233-248.
- Alvarez-Buylla A, Kirn JR (1997) Birth, migration, incorporation, and death of vocal control neurons in adult songbirds. *J Neurobiol* 33:585-601.
- Ampatzis K, Dermon CR (2007) Sex differences in adult cell proliferation within the zebrafish (*Danio rerio*) cerebellum. *Eur J Neurosci* 25:1030-1040.

- Amrein I, Isler K, Lipp H-P (2011) Comparing adult hippocampal neurogenesis in mammalian species and orders: influence of chronological age and life history stage. *Eur J Neurosci* 34:978-987.
- An X-L, Shen W, Ren B-J, Tai F-D (2006) Comparison of the sexual dimorphism of brain structure between mandarin vole (*Microtus mandarinus*) and reed vole (*M. fortis*). *J Shaanxi Normal Univ S1*.
- Andersson M (1994) *Sexual Selection*. Princeton, New Jersey: Princeton University Press.
- Andò S, Panno ML, Ciarcia G, Imbrogno E, Buffone M, Beraldi E, Sisci D, Angelini F, Botte V (1990) Plasma sex hormone concentrations during the reproductive cycle in the male lizard, *Podarcis s. sicula*. *J Reprod Fert* 90:353-360.
- Andò S, Ciarcia G, Panno ML, Imbrogno E, Tarantino G, Buffone M, Beraldi E, Angelini F, Botte V (1992) Sex steroid levels in the plasma and testis during the reproductive cycle of lizard, *Podarcis s. sicula* Raf. *Gen Comp Endocrinol* 85:1-7.
- Ankney CD (1992) Differences in brain size. *Nature* 358:532.
- Aragón P, López P, Martín J (2001) Seasonal changes in activity and spatial and social relationships of the Iberian rock lizard, *Lacerta monticola*. *Can J Zool* 79:1965-1971.
- Arnold SJ (1977) The evolution of courtship behavior in New World salamanders with some comments on Old World salamanders. En: *The Reproductive Strategy of Amphibians* (Taylor DH, Guttman SI, eds), pp 141-183. New York: Plenum Press.
- Arrayago MJ, Bea A (1988) Atlas de citología e histología del aparato reproductor masculino de los anfibios y reptiles del País Vasco. En: *Cuadernos de Sección, Ciencias Naturales* (Sociedad Aranzadi de Estudios Vascos, ed), pp 1-112. Donostia: Editorial Eusko-Ikaskuntza.
- ASAB (2003) Guidelines for the treatment of animals in behavioural research and teaching. *Anim Behav* 65:249-255.
- Asaba A, Hattori T, Mogi K, Kikusui T (2014) Sexual attractiveness of male chemicals and vocalizations in mice. *Front Neurosci* 8:231.
- Astíe AA, Kacelnik A, Reboreda JC (1998) Sexual differences in memory in shiny cowbirds. *Anim Cogn* 1:77-82.
- Baker MC, Bottjer SW, Arnold AP (1984) Sexual dimorphism and lack of seasonal changes in vocal control regions of the white-crowned sparrow brain. *Brain Res* 295:85-89.

- Ball GF, Riters LV, MacDougall-Shackleton EA, Balthazart J (2008) Sex differences in brain and behavior and the neuroendocrine control of the motivation to sing. En: *The Neuroscience of Birdsong* (Zeigler HP, Marler PR, eds), pp 320-331. New York: Cambridge University Press.
- Balthazart J, Foidart A (1993) Brain aromatase and the control of male sexual behavior. *J Steroid Biochem Mol Biol* 44:521-540.
- Baptista LF, Trail PW, DeWolfe BB, Morton ML (1993) Singing and its functions in female white-crowned sparrows. *Anim Behav* 46:511-524.
- Barbosa D, Desfilis E, Carretero MA, Font E (2005) Chemical stimuli mediate species recognition in *Podarcis* wall lizards. *Amphibia-Reptilia* 26:257-263.
- Barbosa D, Font E, Desfilis E, Carretero MA (2006) Chemically mediated species recognition in closely related *Podarcis* wall lizards. *J Chem Ecol* 32:1587-1598.
- Barker JM, Wojtowicz JM, Boonstra R (2005) Where's my dinner? Adult neurogenesis in free-living food-storing rodents. *Genes Brain Behav* 4:89-98.
- Barker JM, Galea LAM (2008) Repeated estradiol administration alters different aspects of neurogenesis and cell death in the hippocampus of female, but not male, rats. *Neuroscience* 152:888-902.
- Barker JM, Boonstra R, Wojtowicz JM (2011) From pattern to purpose: how comparative studies contribute to understanding the function of adult neurogenesis. *Eur J Neurosci* 34:963-977.
- Barnea A, Nottebohm F (1994) Seasonal recruitment of hippocampal neurons in adult free-ranging black-capped chickadees. *PNAS* 91:11217-11221.
- Barnea A, Pravosudov V (2011) Birds as a model to study adult neurogenesis: bridging evolutionary, comparative and neuroethological approaches. *Eur J Neurosci* 34:884-907.
- Bartkowska K, Djavadian RL, Taylor JRE, Turlejski K (2008) Generation, recruitment and death of brain cells throughout the life cycle of *Sorex* shrews (Lipotyphla). *Eur J Neurosci* 27:1710-1721.
- Barton RA, Purvis A, Harvey PH (1995) Evolutionary radiation of visual and olfactory brain systems in primates, bats and insectivores. *Phil Trans R Soc Lond B* 348:381-392.
- Basil JA, Kamil AC, Balda RP, Fite KV (1996) Differences in hippocampal volume among food storing corvids. *Brain Behav Evol* 47:156-64.

- Baum MJ, Keverne EB (2002) Sex difference in attraction thresholds for volatile odors from male and estrous female mouse urine. *Horm Behav* 41:213-219.
- Baxi KN, Dorries KM, Eisthen HL (2006) Is the vomeronasal system really specialized for detecting pheromones? *TINS* 29.
- Bayer SA (1982) Changes in the total number of dentate granule cells in juveniles and adult rats: a correlated volumetric and ³H-thymidine autoradiographic study. *Exp Brain Res* 46:315-323.
- Beck LA, O'Bryant EL, Wade JS (2008) Sex and seasonal differences in morphology of limbic forebrain nuclei in the green anole lizard. *Brain Res* 1227:68-75.
- Beck LA, Wade J (2009a) Sexually dimorphic estrogen receptor α mRNA expression in the preoptic area and ventromedial hypothalamus of green anole lizards. *Horm Behav* 55:398-403.
- Beck LA, Wade J (2009b) Effects of estradiol, sex, and season on estrogen receptor alpha mRNA expression and forebrain morphology in adult green anole lizards. *Neuroscience* 160:577-586.
- Belnoue L, Grosjean N, Abrous DN, Koehl M (2011) A critical time window for the recruitment of bulbar newborn neurons by olfactory discrimination learning. *J Neurosci* 31:1010-1016.
- Bernard DJ, Ball GF (1997) Photoperiodic condition modulates the effects of testosterone on song control nuclei volumes in male European starlings. *Gen Comp Endocrinol* 105:276-283.
- Bernocchi G, Scherini E, Giacometti S, Mareš V (1990) Premitotic DNA synthesis in the brain of the adult frog (*Rana esculenta* L.): an autoradiographic 3H-thymidine study. *Anat Rec* 228:461-470.
- Bédard A, Parent A (2004) Evidence of newly generated neurons in the human olfactory bulb. *Dev Brain Res* 151:159-168.
- Bishop KM, Wahlsten D (1999) Sex and species differences in mouse and rat forebrain commissures depend on the method of adjusting for brain size. *Brain Res* 815:358-366.
- Bleier R, Byne W, Siggelkow I (1982) Cytoarchitectonic sexual dimorphisms of the medial preoptic and anterior hypothalamic areas in guinea pig, rat, hamster, and mouse. *J Comp Neurol* 212:118-130.
- Bodnoff SR, Humphreys AG, Lehman JC, Diamond DM, Rose GM, Meaney MJ (1995) Enduring effects of chronic corticosterone treatment on spatial learning, synaptic plasticity, and hippocampal neuropathology in young and mid-aged rats. *J Neurosci* 15:61-69.

- Bonfanti L, Peretto P, Merighi A, Fasolo A (1997) Newly-generated cells from the rostral migratory stream in the accessory olfactory bulb of the adult rat. *Neuroscience* 81:489-502.
- Bottoni L, Massa R (1981) Seasonal changes in testosterone metabolism in the pituitary gland and central nervous system of the European starling (*Sturnus vulgaris*). *Gen Comp Endocrinol* 43:532-536.
- Bowers JM, Waddell J, McCarthy MM (2010) A developmental sex difference in hippocampal neurogenesis is mediated by endogenous oestradiol. *Biol Sex Differ* 1:8.
- Bradshaw SD (1986) *Ecophysiology of Desert Reptiles*. Sydney: Academic Press.
- Brainard MS, Doupe AJ (2002) What songbirds teach us about learning. *Nature* 417:351-358.
- Brand G, Millot J-L (2001) Sex differences in human olfaction: between evidence and enigma. *Quart J Exp Psychol* 54B:259-270.
- Braña F (1996) Sexual dimorphism in lacertid lizards: male head increase vs female abdomen increase? *Oikos* 75:511-523.
- Brännvall K, Korhonen L, Lindholm D (2002) Estrogen-receptor-dependent regulation of neural stem cell proliferation and differentiation. *Mol Cell Neurosci* 21:512-520.
- Brennan PA, Kendrick KM (2006) Mammalian social odours: attractions and individual recognition. *Phil Trans R Soc Lond B* 361:2061-2078.
- Brenowitz EA, Arnold AP, Levin RN (1985) Neural correlates of female song in tropical duetting birds. *Brain Res* 343:104-112.
- Brenowitz EA, Nalls B, Wingfield JC, Kroodsma DE (1991) Seasonal changes in avian song nuclei without seasonal changes in song repertoire. *J Neurosci* 11:1367-1374.
- Brenowitz EA, Margoliash D, Nordeen KW (1997) An introduction to birdsong and the avian song system. *J Neurobiol* 32:495-500.
- Brenowitz EA, Baptista LF, Lent K, Wingfield JC (1998) Seasonal plasticity of the song control system in wild Nuttall's white-crowned sparrows. *J Neurobiol* 34:69-82.
- Brock O, Keller M, Veyrac A, Douhard Q, Bakker J (2010) Short term treatment with estradiol decreases the rate of newly generated cells in the subventricular zone and main olfactory bulb of adult female mice. *Neuroscience* 166:368-376.
- Brown JP, Couillard-Després S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG (2003) Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol* 467:1-10.

- Brummelte S, Galea LAM (2010) Chronic high corticosterone reduces neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rats. *Neuroscience* 168:680-690.
- Bucci DJ, Chiba AA, Gallagher M (1995) Spatial learning in male and female Long-Evans rats. *Behav Neurosci* 109:180-183.
- Burek MJ, Nordeen KW, Nordeen EJ (1995) Initial sex differences in neuron growth and survival within an avian song nucleus develop in the absence of afferent input. *J Neurobiol* 27:85-96.
- Burghardt GM (1970) Chemical perception in reptiles. En: *Communication by Chemical Signals* (Johnston JW, Moulton DG, Turk A, eds), pp 241-308. New York: Appleton-Century-Crofts.
- Butler AB, Hodos W (2005) *Comparative Vertebrate Neuroanatomy: Evolution and Adaptation*. New York: Wiley-Liss.
- Carazo P, Font E, Desfilis E (2007) Chemosensory assessment of rival competitive ability and scent-mark function in a lizard, *Podarcis hispanica*. *Anim Behav* 74:895-902.
- Carazo P, Font E, Desfilis E (2008) Beyond 'nasty neighbours' and 'dear enemies'? Individual recognition by scent marks in a lizard (*Podarcis hispanica*). *Anim Behav* 76:1953-1963.
- Carazo P (2010) The behavioural ecology of animal signals: a functional theoretical perspective and its application to the study of scent marks in the lizard *Podarcis hispanica*. PhD dissertation, University of Valencia, Valencia.
- Carazo P, Font E, Desfilis E (2011) The role of scent marks in female choice of territories and refuges in a lizard (*Podarcis hispanica*). *J Comp Psychol* 125:362-365.
- Castilla AM, Bauwens D (2000) Reproductive characteristics of the lacertid lizard *Podarcis atrata*. *Copeia* 2000:748-756.
- Catchpole CK, Slater PJB (2008) *Bird Song: Biological Themes and Variations*.
- Cecchi GA, Petreanu LT, Alvarez-Buylla A, Magnasco MO (2001) Unsupervised learning and adaptation in a model of adult neurogenesis. *J Comput Neurosci* 11:175-182.
- Chanas-Sacre G, Rogister B, Moonen G, LePrince P (2000) Radial glia phenotype: origin, regulation, and transdifferentiation. *J Neurosci Res* 61:357-363.
- Chetverukhin VK, Polenov AL (1993) Ultrastructural radioautographic analysis of neurogenesis in the hypothalamus of the adult frog, *Rana temporaria*, with special reference to physiological regeneration of the preoptic nucleus. I. Ventricular zone cell proliferation. *Cell Tissue Res* 271:341-350.

- Clayton NS, Cristol DA (1996) Effects of photoperiod on memory and food storing in captive marsh tits, *Parus palustris*. *Anim Behav* 52:715-726.
- Clayton NS, Reboreda JC, Kacelnik A (1997) Seasonal changes of hippocampus volume in parasitic cowbirds. *Behav Proc* 41:237-243.
- Cohen J (1988) *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*, 2nd edition. Hillsdale, New Jersey: Lawrence Erlbaum Associates.
- Cohen RE, Wade J (2011) Aromatase mRNA in the brain of adult green anole lizards: effects of sex and season. *J Neuroendocrinol* 23:254-260.
- Cohen RE, Roach J, Wade J (2012) The distribution of estrogen receptor β mRNA in male and female green anole lizards. *Brain Res* 1430:43-51.
- Cooke B, Hegstrom CD, Villeneuve LS, Breedlove SM (1998) Sexual differentiation of the vertebrate brain: principles and mechanisms. *Front Neuroendocrinol* 19:323-362.
- Cooper WE, Vitt LJ (1984) Conspecific odor detection by the male broad-headed skink, *Eumeces laticeps*: effects of sex and site of odor source and of male reproductive. *J Exp Zool* 230:199-209.
- Cooper WE (1996) Preliminary reconstructions of nasal chemosensory evolution in Squamata. *Amphibia-Reptilia* 17:395-415.
- Cooper WE, Pérez-Mellado V (2002) Pheromonal discriminations of sex, reproductive condition, and species by the lacertid lizard *Podarcis hispanica*. *J Exp Zool* 523.
- Corotto FS, Henegar JA, Maruniak JA (1993) Neurogenesis persists in the subependymal layer of the adult mouse brain. *Neurosci Lett* 149:111-240.
- Corotto FS, Henegar JR, Maruniak JA (1994) Odor deprivation leads to reduced neurogenesis and reduced neuronal survival in the olfactory bulb of the adult mouse. *Neuroscience* 739-744.
- Costa SS, Andrade R, Carneiro LA, Gonçalves EJ, Kotrschal K, Oliveira RF (2011) Sex differences in the dorsolateral telencephalon correlate with home range size in blennioid fish. *Brain Behav Evol* 77:55-64.
- Cox RM, Skelly SL, John-Alder HB (2003) A comparative test of adaptive hypotheses for sexual size dimorphism in lizards. *Evolution* 57:1653-1669.
- Cox RM, Skelly SL, Leo A, John-Alder HB (2005) Testosterone regulates sexually dimorphic coloration in the eastern fence lizard, *Sceloporus undulatus*. *Copeia* 2005:597-608.

- Cox RM, Butler MA, John-Alder HB (2007) The evolution of sexual size dimorphism in reptiles. (Fairbairn DJ, Blanckenhorn WU, Székely T, eds), pp 38-49. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Cox RM, Barrett MM, John-Alder HB (2008) Effects of food restriction on growth, energy allocation, and sexual size dimorphism in Yarrow's spiny lizard, *Sceloporus jarrovii*. *Can J Zool* 86:268-276.
- Crews D, Wade J, Wilczynski W (1990) Sexually dimorphic areas in the brain of whiptail lizards. *Brain Behav Evol* 36:262-270.
- Crews D, Robker R, Mendonça M (1993) Seasonal fluctuations in brain nuclei in the red-sided garter snake and their hormonal control. *J Neurosci* 13:5356-5364.
- Dark J, Spears N, Whaling CS, Wade GN, Meyer JS, Zucker I (1990) Long day lengths promote brain growth in meadow voles. *Dev Brain Res* 53:264-269.
- Darwin CR (1871) *The Descent of Man, and Selection in Relation to Sex*. London: John Murray.
- Daugherty DR, Callard IP (1972) Plasma corticosterone levels in the male iguanid lizard *Sceloporus cyanogenys* under various physiological conditions. *Gen Comp Endocrinol* 19:69-79.
- Dawley EM, Bass AH (1989) Chemical access to the vomeronasal organs of a plethodontid salamander. *J Morphol* 200:163-174.
- Dawley EM (1992a) Correlation of salamanders vomeronasal and main olfactory system anatomy with habitat and sex: Behavioral interpretations. En: *Chemical Signals in Vertebrates* 6. (Doty RL, Müller-Schwarze D, eds), pp 403-409. New York: Plenum.
- Dawley EM (1992b) Sexual dimorphism in a chemosensory system: the role of the vomeronasal organ in salamander reproductive behavior. *Copeia* 1992:113-120.
- Dawley EM, Crowder J (1995) Sexual and seasonal differences in the vomeronasal epithelium of the red-backed salamander (*Plethodon cinereus*). *J Comp Neurol* 359:382-390.
- Dawley EM (1998) Species, sex, and seasonal differences in VNO size. *Microsc Res Tech* 41:506-518.
- Dawley EM, Fingerlin A, Hwang D, John SS, Stankiewicz CA (2000) Seasonal cell proliferation in the chemosensory epithelium and brain of red-backed salamanders, *Plethodon cinereus*. *Brain Behav Evol* 56:1-13.

- Dawley EM, Nelsen M, Lopata A, Schwartz J, Bierly A (2006) Cell birth and survival following seasonal periods of cell proliferation in the chemosensory epithelia of red-backed salamanders, *Plethodon cinereus*. *Brain Behav Evol* 68:26-36.
- Dawson A, King VM, Bentley GE, Ball GF (2001) Photoperiodic control of seasonality in birds. *J Biol Rhythms* 16:365-380.
- Day LB, Crews D, Wilczynski W (2001) Effects of medial and dorsal cortex lesions on spatial memory in lizards. *Behav Brain Res* 118:27-42.
- Day LB, Guerra M, Schlinger BA, Rothstein SI (2008) Sex differences in the effects of captivity on hippocampus size in brown-headed cowbirds (*Molothrus ater obscurus*). *Behav Neurosci* 122:527-534.
- De Falco M, Sciarrillo R, Virgilio F, Fedele V, Valiante S, Laforgia V, Varano L (2004) Annual variations of adrenal gland hormones in the lizard *Podarcis sicula*. *J Comp Physiol A* 190:-675.
- de Kort SR, Clayton NS (2006) An evolutionary perspective on caching by corvids. *Proc R Soc B* 273:417-423.
- De Vries GJ, Villalba C (1997) Brain sexual dimorphism and sex differences in parental and other social behaviors. *Ann N Y Acad Sci* 807:273-286.
- Dehnel A (1949) Studies on the genus *Sorex* L. *Ann Univ M Curie-Sklod* 4:18-102.
- Delgado-González FJ, Alonso-Fuentes A, Delgado-Fumero A, García-Verdugo JM, González-Granero S, Trujillo-Trujillo CM, Damas-Hernández MC (2008) Seasonal differences in ventricular proliferation of adult *Gallotia galloti* lizards. *Brain Res* 1191:39-46.
- Delgado-González FJ, González-Granero S, Trujillo-Trujillo CM, García-Verdugo JM, Damas-Hernández MC (2011) Study of adult neurogenesis in the *Gallotia galloti* lizard during different seasons. *Brain Res* 1390:50-58.
- DeNardo DF, Licht P (1993) Effects of corticosterone on social behavior in male lizards. *Horm Behav* 27:184-199.
- Desfilis E, Font E, Gómez A (1993a) An ethological study of feeding in the lizard, *Podarcis hispanica*. En: *Lacertids of the Mediterranean Region* (Valakos ED, Böhme W, Pérez-Mellado V, Maragou P, eds), pp 183-198. Athens, Greece: Hellenic Zoological Society.
- Desfilis E, García-Verdugo JM, Font E (1993b) Regeneration in the adult lizard brain: further evidence from 3HT autoradiography. *Eur J Neurosci* 5:290.

- Desfilis E, Font E, Guillén-Salazar F (2003) Stimulus control of predatory behavior by the Iberian wall lizard (*Podarcis hispanica*, Sauria, Lacertidae): effects of familiarity with prey. *J Comp Psychol* 117:309-316.
- DeVoogd TJ, Nottebohm F (1981) Gonadal hormones induce dendritic growth in the adult avian brain. *Science* 214:202-204.
- Díaz JA, Alonso-Gómez AL, Delgado MJ (1994) Seasonal variation of gonadal development, sexual steroids, and lipid reserves in a population of the lizard *Psammodromus algirus*. *J Herpetol* 28:199-205.
- Dorries KM, Adkins-Regan E, Halpern BP (1995) Olfactory sensitivity to the pheromone, androstenone, is sexually dimorphic in the pig. *Physiol Behav* 57:255-259.
- Doty RL, Cameron EL (2009) Sex differences and reproductive hormone influences on human odor perception. *Physiol Behav* 97:213-228.
- Drapeau E, Mayo W, Aurousseau C, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN (2003) Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *PNAS* 100:14385-14390.
- Drapeau E, Abrous DN (2008) Stem cell review series: role of neurogenesis in age-related memory disorders. *Aging Cell* 7:569-589.
- Driscoll I, Howard SR, Stone JC, Monfils MH, Tomanek B, Brooks WM, Sutherland RJ (2006) The aging hippocampus: a multi-level analysis in the rat. *Neuroscience* 139:1173-1185.
- Dunlap KD, Wingfield JC (1995) External and internal influences on indices of physiological stress. I. Seasonal and population variation in adrenocortical secretion of free-living lizards, *Sceloporus occidentalis*. *J Exp Zool* 271:36-46.
- Dunlap KD, Schall JJ (1995) Hormonal alternations and reproductive inhibition in male fence lizards (*Sceloporus occidentalis*) infected with the malarial parasite *Plasmodium mexicanum*. *Physiol Zool* 68:608-621.
- Dunlap KD, Silva AC, Chung M (2011) Environmental complexity, seasonality and brain cell proliferation in a weakly electric fish, *Brachyhypopomus gauderio*. *J Exp Biol* 214:794-805.
- Duvall D (1979) Western fence lizard (*Sceloporus occidentalis*) chemical signals. I. Conspecific discriminations and release of a species-typical visual display. *J Exp Zool* 210:321-326.
- Duvall D, Herskowitz R, Trupiano-Duvall J (1980) Responses of five-lined skinks (*Eumeces fasciatus*) and ground skinks (*Scincella lateralis*) to conspecific and interspecific chemical cues. *J Herpetol* 14:121-127.

- Duvall DL, Guillette LJ, Jones RE (1982) Environmental control of reptilian reproductive cycles. En: *Biology of the Reptilia*. Vol. 13. Physiology D. Physiology Ecology (Gans C, Pough FH, eds), New York: Academic Press.
- Eckenhoff MF, Rakic P (1988) Nature and fate of proliferative cells in the hippocampal dentate gyrus during the life span of the rhesus monkey. *J Neurosci* 8:2729-2747.
- Ehninger D, Kempermann G (2007) Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cell Tissue Res*.
- Ekström P, Johnsson C-M, Ohlin L-M (2001) Ventricular proliferation zones in the brain of an adult teleost fish and their relation to neuromeres and migration (secondary matrix) zones. *J Comp Neurol* 436:92-110.
- Enwere E, Shingo T, Gregg C, Fujikawa H, Ohta S, Weiss S (2004) Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signalling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. *J Neurosci* 24:8354-8365.
- Ferrero DM, Lemon JK, Fluegge D, Pashkovski SL, Korzan WJ, Datta SR, Spehr M, Fendt M, Liberles SD (2011) Detection and avoidance of a carnivore odor by prey. *PNAS* 108:11235-11240.
- Finger JWJ, Thomson PC, Adams AL, Benedict S, Moran C, Isberg SR (2015) Reference levels for corticosterone and immune function in farmed saltwater crocodiles (*Crocodylus porosus*) hatchlings using current Code of Practice guidelines. *Gen Comp Endocrinol* 212:63-72.
- Fitch HS (1981) Sexual size differences in reptiles. *Misc Publ Mus Nat Hist Univ Kans* 70:1-72.
- Fleischhauer K (1957) Untersuchungen am Ependym des Zwischen- und Mittelhirns der Landschildkröte (*Testudo graeca*). *Z Zellforsch* 46:729-765.
- Foley RA, Lee PC, Widdowson EM, Knight CD, Jonxis JHP (1991) Ecology and energetics of encephalization in hominid evolution. *Phil Trans R Soc Lond B* 334:223-232.
- Font E, Schwartz JM (1989) Ketamine as an anesthetic for some squamate reptiles. *Copeia* 1989:484-486.
- Font E, Rome LC (1990) Functional morphology of dewlap extension in the lizard *Anolis equestris* (Iguanidae). *J Morphol* 206:245-258.
- Font E, García-Verdugo JM, Alcántara S, López-García C (1991) Neuron regeneration reverses 3-acetylpyridine-induced cell loss in the cerebral cortex of adult lizards. *Brain Res* 551:230-235.

- Font E (1991) Localization of brainstem motoneurons involved in dewlap extension in the lizard, *Anolis equestris*. Behav Brain Res 45:171-176.
- Font E, García-Verdugo JM, Alcántara S, López-García C (1995) Neuron-glia interrelations during 3-acetylpyridine-induced degeneration and regeneration in the adult lizard brain. En: Neuron-Glia Interrelations During Phylogeny. II. Plasticity and Regeneration (Vernadakis A, Roots B, eds), pp 275-302. Totowa, NJ: Humana Press.
- Font E (1996) Los sentidos químicos de los reptiles. Un enfoque etológico. En: Etología, Psicología Comparada y Comportamiento Animal (Colmenares F, ed), pp 197-259. Madrid: Síntesis.
- Font E, Desfilis E, Pérez-Cañellas MM, Alcántara S, García-Verdugo JM (1997) 3-Acetylpyridine-induced degeneration and regeneration in the adult lizard brain: a qualitative and quantitative analysis. Brain Res 754:245-259.
- Font E, Desfilis E, Pérez-Cañellas MM, García-Verdugo JM (2001) Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult reptilian brain. Brain Behav Evol 58:276-295.
- Font E, Desfilis E (2002) Chemosensory recognition of familiar and unfamiliar conspecifics by juveniles of the Iberian wall lizard *Podarcis hispanica*. Ethology 108:319-330.
- Font E, Pérez i de Lanuza G, Sampedro C (2009) Ultraviolet reflectance and cryptic sexual dichromatism in the ocellated lizard, *Lacerta (Timon) lepida* (Squamata: Lacertidae). Biol J Linn Soc 97:766-780.
- Font E, Carazo P, Pérez i de Lanuza G (2010) Comportamiento y comunicación animal: ¿Qué nos enseñan los lagartos? Acta Zoológica Lilloana 54:12-35.
- Font E, Barbosa D, Sampedro C, Carazo P (2012) Social behavior, chemical communication, and adult neurogenesis: Studies of scent mark function in *Podarcis* wall lizards. Gen Comp Endocrinol 177:9-17.
- Forester DC, Anders CL (2000) Contributions to the life history of the redback salamander, *Plethodon cinereus*. En: The Biology of Plethodontid Salamanders (Bruce RC, Jaeger RG, Houck LD, eds), pp 407-416. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers.
- Forlano PM, Schlinger BA, Bass AH (2006) Brain aromatase: new lessons from non-mammalian model systems. Front Neuroendocrinol 27:247-274.
- Fowler CD, Freeman ME, Wang Z (2003) Newly proliferated cells in the adult male amygdala are affected by gonadal steroid hormones. J Neurobiol 57:257-269.

- Fraga RM (1991) Biparental care in bay-winged cowbirds *Molothrus badius*. *Ethology* 89:195-210.
- Frahm HD (1981) Volumetric comparison of the accessory olfactory bulb in bats. *Acta Anat (Basel)* 109:173-183.
- Franklin CE, Davis BM, Peucker SKJ, Stephenson H, Mayer R, Whittier J, Lever J, Grigg GC (2003) Comparison of stress induced by manual restraining and immobilisation in the estuarine crocodile, *Crocodylus porosus*. *J Exp Zool* 298A:86-92.
- Friedmann H, Kiff LF (1985) The parasitic cowbirds and their hosts. *Proc West Found Vert Zool* 2:226-304.
- Fusani L, Van't Hof T, Hutchinson JB, Gahr M (2000) Seasonal expression of androgen receptors, estrogen receptors, and aromatase in the canary brain in relation to circulating androgens and estrogens. *J Neurobiol* 43:254-268.
- Gage FH, van Praag H (2002) Neurogenesis in adult brain. En: *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*. (Davis KL, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C, eds), pp 109-118. Philadelphia, Pennsylvania, USA: American College of Neuropsychopharmacology.
- Gahr M, Metzendorf R (1997) Distribution and dynamics in the expression of androgen and estrogen receptors in vocal control systems of songbirds. *Brain Res Bull* 44:509-517.
- Galea LAM, Kavaliers M, Ossenkopp K-P, Hampson E (1995) Gonadal hormones levels and spatial learning performance in the Morris water maze in male and female meadow voles, *Microtus pennsylvanicus*. *Horm Behav* 29:106-125.
- Galea LAM, Kavaliers M, Ossenkopp K-P (1996) Sexually dimorphic spatial learning in meadow voles *Microtus pennsylvanicus* and deer mice *Peromyscus maniculatus*. *J Exp Biol* 199:195-200.
- Galea LAM, McEwen BS (1999) Sex and seasonal differences in the rate of cell proliferation in the dentate gyrus of adult wild meadow voles. *Neuroscience* 89:955-964.
- Galea LAM, Perrot-Sinal TS, Kavaliers M, Ossenkopp K-P (1999) Relations of hippocampal volume and dentate gyrus width to gonadal hormone levels in male and female meadow voles. *Brain Res* 821:383-391.
- Galea LAM (2008) Gonadal hormone modulation of neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rodents. *Brain Res Rev* 57:332-341.
- Garamszegi LZ, Eens M (2004) The evolution of hippocampus volume in brain size in relation to food hoarding in birds. *Ecol Lett* 7:1216-1224.

- Garamszegi LZ, Eens M, Erritzøe J, Møller AP (2005) Sexually size dimorphic brains and song complexity in passerine birds. *Behav Ecol* 16:335-345.
- García-Verdugo JM, Fariñas I, Molowny A, López-García C (1986) Ultrastructure of putative migrating cells in the cerebral cortex of *Lacerta galloti*. *J Morphol* 189:189-197.
- García-Verdugo JM, Llahi S, Ferrer I, López-García C (1989) Postnatal neurogenesis in the olfactory bulbs of a lizard. A tritiated thymidine autoradiographic study. *Neurosci Lett* 98:247-252.
- García-Verdugo JM, Ferrón S, Flames N, Collado L, Desfilis E, Font E (2002) The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds, and mammals. *Brain Res Bull* 57:765-775.
- Gaulin SJC, Fitzgerald RW (1986) Sex differences in spatial ability: an evolutionary hypothesis and test. *Am Nat* 127:74-88.
- Gaulin SJC, Fitzgerald RW (1988) Home-range size as a predictor of mating systems in *Microtus*. *J Mammal* 69:311-319.
- Geniez P, Cluchier A, Sá-Sousa P, Guillaume CP, Crochet P-A (2007) Systematics of the *Podarcis hispanicus*-complex (Sauria, Lacertidae) I: redefinition, morphology and distribution of the nominotypical taxon. *Herpetol J* 17:69-80.
- Getz LL, Hoffmann JE (1986) Social organization in free-living prairie voles, *Microtus ochrogaster*. *Behav Ecol Sociobiol* 18:275-282.
- Gheusi G, Cremer H, McLean H, Chazal G, Vincent J-D, Lledo P-M (2000) Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. *PNAS* 97:1823-1828.
- Gheusi G, Lledo P-M (2007) Control of early events in olfactory processing by adult neurogenesis. *Chem Senses* 32:397-409.
- Gil M, Pérez-Mellado V, Guerrero F (1988) Estructura del hábitat y dominios vitales en *Podarcis hispanica* (Steindachner, 1870). *Misc Zool* 12:273-281.
- Gillette JR, Kolb SE, Smith JA, Jaeger RG (2000) Pheromonal attractions to particular males by female redback salamanders (*Plethodon cinereus*). En: *The Biology of Plethodontid Salamanders* (Bruce RC, Jaeger RG, Houck LD, eds), pp 431-440. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers.
- Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA (1999) Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* 23:257-271.

- Goffinet AM (1983) The embryonic development of the cortical plate in reptiles: a comparative analysis in *Emys orbicularis* and *Lacerta agilis*. *J Comp Neurol* 215:437-452.
- Goffinet AM, Daumerie CH, Langerwerf B, Pieau C (1986) Neurogenesis in reptilian cortical structures: ³H-thymidine autoradiographic analysis. *J Comp Neurol* 243:106-116.
- Goldman SA, Nottebohm F (1983) Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *PNAS* 80:2390-2394.
- González-Granero S, Desfilis E, García-Verdugo JM (2006) Does tangential migration to olfactory bulbs exist in lizards?
- Gorski RA, Harlan RE, Jacobson CD, Shryne JE, Southam AM (1980) Evidence for the existence of a sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat. *J Comp Neurol* 193:529-539.
- Gould E, Westlind-Danielsson A, Frankfurt M, McEwen BS (1990) Sex differences and thyroid hormone sensitivity of hippocampal pyramidal cells. *J Neurosci* 10:996-1003.
- Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flügge G, Fuchs E (1998) Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *PNAS* 95:3168-3171.
- Gould E, Tanapat P, Hastings NB, Shors TJ (1999) Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning. *TICS* 3:186-192.
- Gould E (2007) How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat Rev Neurosci* 8:481-488.
- Gould KL, Gilbertson KE, Hrvol AJ, Nelson JC, Seyfer AL, Brantner RM, Kamil AC (2013) Differences in relative hippocampus volume and number of hippocampus neurons among five corvid species. *Brain Behav Evol* 81:56-70.
- Gómez A, Font E, Desfilis E (1993) Chemoreception in the Lacertidae: exploration and conspecific discrimination in the Spanish wall lizard, *Podarcis hispanica*. En: *Lacertids in the Mediterranean Region: A Biological Approach* (Valakos ED, Böhme W, Pérez-Mellado V, Maragou P, eds), pp 213-230. Athens, Greece: Hellenic Zoological Society.
- Grandel H, Kaslin J, Ganz J, Wenzel I, Brand M (2006) Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. *Dev Neurobiol* 295:263-277.
- Green AJ (2001) Mass/length residuals: measures of body condition or generators of spurious results? *Ecology* 82:1473-1483.

- Greenberg B, Noble GK (1944) Social behavior of the American chamaleon (*Anolis carolinensis* Voight). *Physiol Zool* 17:392-439.
- Gross CG (2000) Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat Neurosci Rev* 1:67-73.
- Guillette LJ, Cree A, Rooney AA (1995) Biology of stress: interactions with reproduction, immunology and intermediary metabolism. En: *Health and Welfare of Captive Reptiles* (Warwick C, Frye FL, Murphy JB, eds), pp 32-81. London: Chapman & Hall.
- Gulledge CC, Deviche P (1997) Androgen control of vocal control region volumes in a wild migratory songbird (*Junco hyemalis*) is region and possibly age dependent. *J Neurobiol* 32:391-402.
- Gurney ME, Konishi M (1980) Hormone-induced sexual differentiation of brain and behavior in zebra finches. *Science* 208:1380-1383.
- Hahn HW (1941) The cowbird at the nest. *Wilson Bull* 53:211-221.
- Halem HA, Cherry JA, Baum MJ (1999) Vomeronasal neuroepithelium and forebrain Fos responses to male pheromones in male and female mice. *J Neurobiol* 39:249-263.
- Halpern M, Morrell JI, Pfaff DW (1982) Cellular [³H]estradiol and [³H]testosterone localization in the brain of garter snakes: an autoradiographic study. pp 211-224.
- Halpern M (1992) Nasal chemical senses in reptiles: structure and function. En: *Biology of the Reptilia*. Vol. 18. Hormones, Brain, and Behaviour (Gans C, Crews D, eds), pp 423-523. Chicago: University of Chicago Press.
- Hamdani EH, Lastein S, Gregersen F, Døving KB (2008) Seasonal variations in olfactory sensory neurons - fish sensitivity to sex pheromones explained? *Chem Senses* 33:119-123.
- Hampton RR, Sherry DF, Shettleworth SJ, Khurgel M (1995) Hippocampal volume and food-storing behavior are related in parids. *Brain Behav Evol* 45:54-61.
- Hampton RR, Shettleworth SJ (1996) Hippocampal lesions impair memory for location but not color in passerine birds. *Behav Neurosci* 110:831-835.
- Hansen A, Schmidt M (2004) Influence of season and environment on adult neurogenesis in the central olfactory pathway of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Brain Res* 1025:85-97.
- Harris DJ, Sá-Sousa P (2002) Molecular phylogenetics of Iberian wall lizards (*Podarcis*): is *Podarcis hispanica* a species complex? *Mol Phylogenet Evol* 23:75-81.

- Healy SD, Guilford T (1990) Olfactory-bulb size and nocturnality in birds. *Evolution* 44:339-346.
- Healy SD, Krebs JR (1992) Food storing and the hippocampus in corvids: amount and volume are correlated. *Proc R Soc B* 248:241-245.
- Healy SD, Krebs JR (1996) Food storing and the hippocampus in Paridae. *Brain Behav Evol* 47:195-199.
- Healy SD, Braham SR, Braithwaite VA (1999) Spatial working memory in rats: no differences between the sexes. *Proc R Soc Lond B* 266:2303-2308.
- Healy SD, de Kort SR, Clayton NS (2005) The hippocampus, spatial memory and food hoarding: a puzzle revisited. *TREE* 20:17-22.
- Herrel A, Spithoven L, Van Damme R, De Vree F (1999) Sexual dimorphism of head size in *Gallotia galloti*: testing the niche divergence hypothesis by functional analyses. *Funct Ecol* 13:289-297.
- Herrel A, Van Damme R, Vanhooydonck B, De Vree F (2001) The implications of bite performance for diet in two species of lacertid lizards. *Can J Zool* 79:662-670.
- Hetzel W (1974) Die Ontogenese des Telencephalons bei *Lacerta sicula* (Rafinesque) mit besonderer Berücksichtigung der pallialen Entwicklung. *Zool Garten* 20:361-458.
- Heymann EW (1998) Sex differences in olfactory communication in a primate, the moustached tamarin, *Saguinus mystax* (Callitrichinae). *Behav Ecol Sociobiol* 43:37-45.
- Hidalgo A, Barami K, Iversen K, Goldman SA (1995) Estrogens and non-estrogenic ovarian influences combine to promote the recruitment and decrease the turnover of new neurons in the adult female canary brain. *J Neurobiol* 27:470-487.
- Hill KM, DeVoogd TJ (1991) Altered daylength affects dendritic structure in a song-related brain region in red-winged blackbirds. *Behav Neural Biol* 56:240-250.
- Holmes MM, Wade J (2004a) Characterization of projections from a sexually dimorphic motor nucleus in the spinal cord of adult green anoles. *J Comp Neurol* 471:180-187.
- Holmes MM, Wade J (2004b) Seasonal plasticity in the copulatory neuromuscular system of green anole lizards: a role for testosterone in muscle but not motoneuron morphology. *J Neurobiol* 60:1-11.
- Hoshooley JS, Phillmore LS, MacDougall-Shackleton SA (2005) An examination of avian hippocampal neurogenesis in relationship to photoperiod. *NeuroReport* 16:987-991.

- Hoshooley JS, Sherry DF (2007) Greater hippocampal neuronal recruitment in food-storing than in non-food-storing birds. *Dev Neurobiol* 67:406-414.
- Hoshooley JS, Phillmore LS, Sherry DF, MacDougall-Shackleton SA (2007) Annual cycle of the black-capped chickadee: seasonality of food-storing and the hippocampus. *Brain Behav Evol* 69:161-168.
- Hoyk Z, Varga C, Párducz Á (2006) Estrogen-induced region specific decrease in the density of 5-bromo-2deoxyuridine-labelled cells in the olfactory bulb of adult female rats. *Neuroscience* 141:1919-1924.
- Huang L, DeVries GJ, Bittman EL (1998) Photoperiod regulates neuronal bromodeoxyuridine labeling in the brain of a seasonally breeding mammal. *J Neurobiol* 36:410-420.
- Hurley LL, Wallace AM, Sartor JJ, Ball GF (2008) Photoperiodic induced changes in reproductive state of border canaries (*Serinus canaria*) are associated with marked variation in hypothalamic gonadotropin-releasing hormone immunoreactivity and the volume of song control regions. *Gen Comp Endocrinol* 158:10-19.
- Isberg SR, Shilton CM (2013) Stress in farmed saltwater crocodiles (*Crocodylus porosus*): no difference between individually- and communally-housed animals. *Springerplus* 2:381.
- Isler K, van Schaik CP (2006) Metabolic costs of brain size evolution. *Biol Lett* 2:557-560.
- Jacobs LF, Gaulin SJC, Sherry DF, Hoffman GE (1990) Evolution of spatial cognition: sex-specific patterns of spatial behavior predict hippocampal size. *PNAS* 87:6349-6352.
- Jacobs LF, Liman ER (1991) Grey squirrels remember the locations of buried nuts. *Anim Behav* 41:103-110.
- Jacobs LF, Spencer WD (1994) Natural space-use patterns and hippocampal size in kangaroo rats. *Brain Behav Evol* 44:125-132.
- Jaeger RG (1986) Pheromonal markers as territorial advertisement by terrestrial salamanders. En: *Chemical Signals in Vertebrates 4. Ecology, Evolution, and Comparative Biology* (Duvall D, Müller-Schwarze D, Silverstein RM, eds), pp 191-203. New York: Plenum.
- Jaeger RG, Peterson MG, Gillette JR (2000) A model of alternative mating strategies in the redback salamander, *Plethodon cinereus*. En: *The Biology of Plethodontid Salamanders* (Bruce RC, Jaeger RG, Houck LD, eds), pp 441-450. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers.
- Johnson MA, Wade J (2010) Behavioural display systems across nine *Anolis* lizard species: sexual dimorphisms in structure and function. *Proc R Soc B* 277:1711-1719.

- Jonasson Z (2005) Meta-analysis of sex differences in rodent models of learning and memory: a review of behavioral and biological data. *Neurosci Biobehav Rev* 28:811-825.
- Kabelik D, Weiss SL, Moore MC (2006) Steroid hormone mediation of limbic brain plasticity and aggression in free-living tree lizards, *Urosaurus ornatus*. *Horm Behav* 49:587-597.
- Kabelik D, Weiss SL, Moore MC (2008) Steroid hormones alter neuroanatomy and aggression independently in the tree lizard. *Physiol Behav* 93:492-501.
- Kaliontzopoulou A, Pinho C, Harris DJ, Carretero MA (2011) When cryptic diversity blurs the picture: a cautionary tale from Iberian and North African *Podarcis* wall lizards. *Biol J Linn Soc* 103:779-800.
- Kaliontzopoulou A, Carretero MA, Llorente GA (2012) Morphology of the *Podarcis* wall lizards (Squamata: Lacertidae) from the Iberian Peninsula and North Africa: patterns of variation in a putative cryptic species complex. *Zool J Linn Soc* 164:173-193.
- Kaplan MS, Hinds JW (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197:1092-1094.
- Karuzas JM, Maerz JC, Madison DM (2004) An alternative hypothesis for the primary function of a proposed mate assessment behaviour in red-backed salamanders. *Anim Behav* 68:489-494.
- Kaslin J, Ganz J, Brand M (2008) Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain. *Phil Trans R Soc B* 363:101-122.
- Katz A, Mirzaton A, Zhen Y, Schlinger BA (2008) Sex differences in cell proliferation and glucocorticoid responsiveness in the zebra finch brain. *Eur J Neurosci* 28:99-106.
- Källén B (1951) Contributions to the knowledge of the medial wall of the reptilian forebrain. *Acta Anat* 13:90-100.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386:493-495.
- Kempermann G (2002) Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* 22:635-638.
- Kempermann G (2006) *Adult Neurogenesis. Stem Cells and Neuronal Development in the Adult Brain*. New York: Oxford University Press.
- Kempermann G (2011) Seven principles in the regulation of adult neurogenesis. *Eur J Neurosci* 33:1018-1024.

- Kerver HN, Wade J (2013) Seasonal and sexual dimorphisms in expression of androgen receptor and its coactivators in brain and peripheral copulatory tissues of the green anole. *Gen Comp Endocrinol* 193:56-67.
- Kerver HN, Wade J (2014) Relationships among Sex, Season and Testosterone in the Expression of Androgen Receptor mRNA and Protein in the Green Anole Forebrain. *Brain Behav Evol* 84:303-314.
- Keverne EB (2004) Importance of olfactory and vomeronasal systems for male sexual function. *Physiol Behav* 83:177-187.
- Kirn JR, Clower RP, Kroodsmas DE, DeVoogd TJ (1989) Song-related brain regions in the red-winged blackbird are affected by sex and season but not repertoire size. *J Neurobiol* 20:139-163.
- Kirn JR, DeVoogd TJ (1989) Genesis and death of vocal control neurons during sexual differentiation in the zebra finch. *J Neurosci* 9:3176-3187.
- Kirn JR, Nottebohm F (1993) Direct evidence of loss and replacement of projection neurons in adult canary brain. *J Neurosci* 13:1654-1663.
- Kirn JR, O'Loughlin B, Kasparian S, Nottebohm F (1994) Cell death and neuronal recruitment in the High Vocal Center of adult male canaries are temporally related to changes in song. *PNAS* 91:7844-7848.
- Kirn JR, Schwabl H (1997) Photoperiod regulation of neuron death in the adult canary. *J Neurobiol* 33:223-231.
- Kirsche W (1967) Über postembryonale Matrixzonen im Gehirn verschiedener Vertebraten und deren Beziehung zur Hirnbauplanlehre. *Z Mikrosk-anat Forsch* 77:313-406.
- Konishi M (1965a) Effects of deafening on song development in American robins and black-headed grosbeaks. *Z Tierpsychol* 22:584-599.
- Konishi M (1965b) The role of auditory feedback in the control of vocalization in the white-crowned sparrow. *Z Tierpsychol* 22:770-783.
- Konishi M, Akutagawa E (1990) Growth and atrophy of neurons labeled at their birth in a song nucleus of the zebra finch. *PNAS* 87:3538-3541.
- Kornack DR, Rakic P (2001) The generation, migration, differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. *PNAS* 98:4752-4757.

- Krebs JR, Sherry DF, Healy SD, Perry VH, Vaccarino AL (1989) Hippocampal specialization of food-storing birds. PNAS 86:1388-1392.
- Krebs JR (1990) Food-storing birds: adaptive specialization in brain and behaviour? Phil Trans R Soc Lond B 329:153-160.
- Krebs JR, Clayton NS, Hampton RR, Shettleworth SJ (1995) Effects of photoperiod on food-storing and the hippocampus in birds. NeuroReport 6:1701-1704.
- Kroodsma DE, Miller EH (1996) Ecology and Evolution of Acoustic Communication in Birds. Ithaca, New York: Cornell University Press.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. J Neurosci 16:2027-2033.
- LaDage LD, Maged M, Forney MV, Roth TC, Sinervo B, Pravosudov VV (2013) Interaction between territoriality, spatial environment, and hippocampal neurogenesis in male side-blotched lizards. Behav Neurosci 127:555-565.
- Lagace DC, Fischer SJ, Eisch AJ (2007) Gender and endogenous levels of estradiol do not influence adult hippocampal neurogenesis in mice. Hippocampus 17:175-180.
- Lansing SW, Lonstein JS (2006) Tyrosine hydroxylase-synthesizing cells in the hypothalamus of prairie voles (*Microtus ochrogaster*): sex differences in the anteroventral periventricular preoptic area and effects of adult gonadectomy or neonatal gonadal hormones. J Neurobiol 66:197-204.
- Latham S, Wade J (2010) Estradiol facilitates mounting behavior in male green anole lizards. Physiol Behav 99:78-81.
- Lavenex P, Steele MA, Jacobs LF (2000a) Sex differences, but no seasonal variations in the hippocampus of food-caching squirrels: a stereological study. J Comp Neurol 425:152-166.
- Lavenex P, Steele MA, Jacobs LF (2000b) The seasonal pattern of cell proliferation and neuron number in the dentate gyrus of wild adult eastern grey squirrels. Eur J Neurosci 12:643-648.
- Lemasson M, Saghatelian A, Olivo-Marin J-C, Lledo P-M (2005) Neonatal and adult neurogenesis provide two distinct populations of newborn neurons to the mouse olfactory bulb. J Neurosci 25:6816-6825.
- Li C, Brake WG, Romeo RD, Dunlop JC, Gordon M, Buzescu R, Magarinos AM, Allen PB, Greengard P, Luine V, McEwen BS (2004) Estrogen alters hippocampal dendritic spine shape and enhances synaptic protein immunoreactivity and spatial memory in female mice. PNAS 101:2185-2190.

- Licht P, Hoyer HE, Van Oordt PG (1969) Influence of photoperiod and temperature on testicular recrudescence and body growth in the lizards, *Lacerta sicula* and *Lacerta muralis*. *J Zool* 157:469-501.
- Licht P (1971) Regulation of the annual testis cycle by photoperiod and temperature in the lizard *Anolis carolinensis*. *Ecology* 52:240-252.
- Liu Y, Lieberwirth C, Jia X, Curtis JT, Meredith M, Wang ZX (2014) Chemosensory cues affect amygdaloid neurogenesis and alter behaviors in the socially monogamous prairie vole. *Eur J Neurosci* 39:1632-1641.
- Lledo P-M, Gheusi G (2003) Olfactory processing in a changing brain. *NeuroReport* 14:1655-1663.
- Lois C, Alvarez-Buylla A (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264:1145-1148.
- Lois C, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1996) Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271:978-981.
- López-García C, Tineo PL, del Corral J (1984) Increase of the neuron number in some cerebral cortical areas of a lizard, *Podarcis hispanica*, (Steind., 1870), during postnatal periods of life. *J Hirnforsch* 25:255-259.
- López-García C, Molowny A, García-Verdugo JM, Ferrer I (1988) Delayed postnatal neurogenesis in the cerebral cortex of lizards. *Dev Brain Res* 43:167-174.
- López-García C, Molowny A, García-Verdugo JM, Pérez-Sánchez F, Martínez-Guijarro FJ (1990a) Postnatal neurogenesis in the brain of the lizard *Podarcis hispanica*. En: *The Forebrain in Nonmammals: New Aspects of Structure and Development* (Schwerdtfeger WK, Germroth P, eds), pp 103-117. Berlin: Springer-Verlag.
- López-García C, Molowny A, García-Verdugo JM, Martínez-Guijarro FJ, Bernabeu A (1990b) Late generated neurons in the medial cortex of adult lizards send axons that reach the Timm-reactive zones. *Develop Brain Res* 57:249-254.
- López-García C, Molowny A, Martínez-Guijarro FJ, Blasco-Ibáñez JM, Luis de la Iglesia JA, Bernabeu A, García-Verdugo JM (1992) Lesion and regeneration in the medial cerebral cortex of lizards. *Histol Histopathol* 7:725-746.
- López JC, Vargas JP, Gómez Y, Salas C (2003) Spatian and non-spatial learning in turtles: the role of medial cortex. *Behav Brain Res* 143:109-120.

- López P, Martín J (2002) Chemical rival recognition decreases aggression levels in male Iberian wall lizards, *Podarcis hispanica*. Behav Ecol Sociobiol 51:461-465.
- López P, Martín J (2005) Female Iberian wall lizards prefer male scents that signal a better cell-mediated immune response. Biol Lett 1:404-406.
- López P, Moreira PL, Martín J (2009) Chemical polymorphism and chemosensory recognition between *Iberolacerta monticola* lizard color morphs. Chem Senses 34:723-731.
- Luskin MB (1993) Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. Neuron 11:173-189.
- MacDougall-Shackleton SA, Sherry DF, Clark AP, Pinkus R, Hernández AM (2003) Photoperiod regulation of food storing and hippocampus volume in black-capped chickadees, *Poecile atricapillus*. Anim Behav 65:805-812.
- Madeira MD, Lieberman AR (1995) Sexual dimorphism in the mammalian limbic system. Prog Neurobiol 45:275-333.
- Madison DM, McShea WJ (1987) Seasonal changes in reproductive tolerance, spacing and social organization in meadow voles: a microtine model. Am Zool 27:899-908.
- Madison FN, Rouse MLJ, Balthazart J, Ball GF (2014) Reversing song behavior phenotype: testosterone driven induction of singing and measures of song quality in adult male and female canaries (*Serinus canaria*). Gen Comp Endocrinol.
- Maico LM, Roslinski DL, Burrows AM, Mooney MP, Siegel MI, Kunwar PB, Smith TD (2001) Size of the vomeronasal organ in wild *Microtus*. En: Chemical Signals in Vertebrates, 9 (Marchlewska-Koj A, Lepri JJ, Müller-Schwarze D, eds), pp 101-105. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Maico LM, Burrows AM, Mooney MP, Siegel MI, Bhatnagar KP, Smith TD (2003) Size of the vomeronasal organ in wild *Microtus* with different mating strategies. Acta Biologica Hungarica 54:263-273.
- Maine AR, Powers SD, Lutterschmidt DI (2014) Seasonal variation in cell proliferation and cell migration in the brain of adult red-sided garter snakes (*Thamnophis sirtalis parietalis*). Brain Behav Evol 84:181-196.
- Mansfield JH, Quan W, Jia C, Halpern M (2005) Sexual dimorphism in the accessory olfactory bulb and vomeronasal organ of the gray short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. En: Chemical Signals in Vertebrates, 10 (Mason RT, Lemaster MP, Müller-Schwarze D, eds), pp 283-290. New York: Springer.

- Manzo C, Zerani M, Gobetti A, Di Fiore MM, Angelini F (1994) Is corticosterone involved in the reproductive processes of the male lizard, *Podarcis sicula sicula*. *Horm Behav* 28:117-129.
- Marchioro M, De Azevedo J-M, Rabelo-Ramalho AM, Molowny A, Pérez-Martínez E, Ponsoda X, López-García C (2005) Postnatal neurogenesis in the medial cortex of the tropical lizard *Tropidurus hispidus*. *Neuroscience* 134:407-413.
- Marchioro M, Pimentel H, Santos ML, Lima MM, Dos Santos JR, Martí XP, Molowny A, Garcia CL (2012) Low temperature-acclimation impairs cellular migration in the adult cerebral cortex of the tropical lizard, *Tropidurus hispidus* (Spix, 1825)(Squamata: Tropiduridae). *Arch Ital Biol* 150:22-30.
- Martin SB, Jaeger RG, Prosen ED (2005) Territorial red-backed salamanders can detect volatile pheromones from intruders. *Herpetologica* 61:29-35.
- Martins EP, Ord TJ, Slaven J, Wright JL, Housworth EA (2006) Individual, sexual, seasonal, and temporal variation in the amount of sagebrush lizard scent marks. *J Chem Ecol* 32:881-893.
- Martín J, López P (2006) Interpopulational differences in chemical composition and chemosensory recognition of femoral gland secretions of male lizards *Podarcis hispanica*: implications for sexual isolation in a species complex. *Chemoecol* 16:31-38.
- Martín J, López P, Gabirot M, Pilz KM (2007) Effects of testosterone supplementation on chemical signals of male Iberian wall lizards: consequences for female mate choice. *Behav Ecol Sociobiol* 61:1275-1282.
- Martonciková M, Lievajová K, Orendáčová J, Blaško J, Raceková E (2011) Odor enrichment influences neurogenesis in the rostral migratory stream of young rats. *Acta Histochem* 113:326-332.
- Mason P (1987) Pair formation in cowbirds. Evidence found for screaming but not shiny cowbirds. *Condor* 89:349-356.
- Mason RT, Chinn JW, Crews D (1987) Sex and seasonal differences in the skin lipids of garter snakes. *Comp Biochem Physiol* 87B:999-1003.
- Mason RT (1992) Reptilian Pheromones. En: *Biology of the Reptilia*. Vol. 18. Hormones, Brain, and Behaviour (Gans C, Crews D, eds), pp 114-228. Chicago: University of Chicago Press.
- Mathis A (1990) Territorial salamanders assess sexual and competitive information using chemical signals. *Anim Behav* 40:953-962.
- Mathis A (1991) Territories of male and female terrestrial salamanders: costs, benefits, and intersexual spatial associations. *Oecologia* 86:433-440.

- McCarthy MM, Konkle ATM (2005) When is a sex difference not a sex difference? *Front Neuroendocrinol* 26:85-102.
- Meitzen J, Thompson CK (2008) Seasonal-like growth and regression of the avian song control system: Neural and behavioral plasticity in adult male Gambel's white-crowned sparrows. *Gen Comp Endocrinol* 157:259-265.
- Minelli G, Del Grande P, Mambelli MC (1978) Preliminary study of the regenerative processes of the dorsal cortex of the telencephalon of *Lacerta viridis*. *Z Mikrosk-anat Forsch* 91:241-246.
- Minelli G, Del Grande P, Franceschini V (1982) Uptake of 6-H³-thymidine in the normal and regenerating CNS of *Rana esculenta*. *Z Mikrosk-anat Forsch* 96:201-213.
- Molina-Borja M (2003) Sexual dimorphism of *Gallotia atlantica atlantica* and *Gallotia atlantica mahoratae* (Lacertidae) from the Eastern Canary Islands. *J Herpetol* 37:769-772.
- Molowny A, Nacher J, López-García C (1995) Reactive neurogenesis during regeneration of the lesioned medial cerebral cortex of lizards. *Neuroscience* 68:823-836.
- Montaron MF, Drapeau E, Dupret D, Kitchener P, Arousseau C, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN (2006) Lifelong corticosterone level determines age-related decline in neurogenesis and memory. *Neurobiol Aging* 27:645-654.
- Moore MC, Thompson CW (1990) Field endocrinology of reptiles: hormonal control of alternative male reproductive tactics. En: *Progress in Comparative Endocrinology* (Epple A, Scanes CG, Stetson MH, eds), pp 685-690. New York: Wiley-Liss.
- Moore MC, Lindzey J (1992) The physiological basis of sexual behavior in male reptiles. En: *Biology of the Reptilia*. Vol. 18. Physiology E. Hormones, Brain, and Behavior (Gans C, Crews D, eds), pp 70-113. Chicago: University of Chicago Press.
- Murias AR, Weruaga E, Recio JS, Airado C, Díaz D, Alonso JR (2007) Distribution of neurocalcin-containing neurons reveals sexual dimorphism in the mouse olfactory bulb. *Chem Senses* 32:673-680.
- Newman AEM, MacDougall-Shackleton SA, An Y-S, Kriengwatana B, Soma KK (2010) Corticosterone and dehydroepiandrosterone have opposing effects on adult neuroplasticity in the avian song control system. *J Comp Neurol* 518:3662-3678.
- Ngwenya A, Patzke N, Spocter MA, Kruger J-L, Dell L-A, Chawana R, Mazenganya P, Billings BK, Olaleye O, Herculano-Houzel S, Manger PR (2013) The continuously growing central nervous system of the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*). *Anat Rec* 296:1489-1500.

- Nicholls TJ, Goldsmith AR, Dawson A (1988) Photorefractoriness in birds and comparison with mammals. *Physiol Rev* 68:133-176.
- Nordeen EJ, Nordeen KW (1988) Sex and regional differences in the incorporation of neurons born during song learning in zebra finches. *J Neurosci* 8:2869-2874.
- Nordeen EJ, Grace A, Burek MJ, Nordeen KW (1992) Sex-dependent loss of projection neurons involved in avian song learning. *J Neurobiol* 23:671-679.
- Nottebohm F, Stokes TM, Leonard CM (1976) Central control of song in the canary, *Serinus canarius*. *J Comp Neurol* 165:457-486.
- Nottebohm F, Arnold AP (1976) Sexual dimorphism in vocal control areas of the songbird brain. *Science* 194:211-213.
- Nottebohm F (1980) Testosterone triggers growth of brain vocal control nuclei in adult female canaries. *Brain Res* 189:429-436.
- Nottebohm F (1981) A brain for all seasons: cyclical anatomical changes in song control nuclei of the canary brain. *Science* 214:1368-1370.
- Nottebohm F, Nottebohm ME, Crane L (1986) Developmental and seasonal changes in canary song and their relation to changes in the anatomy of song-control nuclei. *Behav Neural Biol* 46:445-471.
- Nottebohm F, O'Loughlin B, Gould K, Yohay K, Alvarez-Buylla A (1994) The life span of new neurons in a song control nucleus of the adult canary brain depends on time of year when these cells are born. *PNAS* 91:7849-7853.
- Nottebohm F, Liu W-C (2010) The origins of vocal learning: New sounds, new circuits, new cells. *Brain & Language* 115:3-17.
- Nunez-Parra A, Pugh V, Araneda RC (2011) Regulation of adult neurogenesis by behavior and age in the accessory olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci* 47:274-285.
- Nuñez JL, Koss WA, Juraska JM (2000) Hippocampal anatomy and water maze performance are affected by neonatal cryoanesthesia in rats of both sexes. *Horm Behav* 37:169-178.
- O'Bryant EL, Wade J (1999) Sexual dimorphisms in a neuromuscular system regulating courtship in the green anole lizard: effects of season and androgen treatment. *J Neurobiol* 40:202-213.
- O'Bryant EL, Wade J (2002a) Seasonal and sexual dimorphisms in the green anole forebrain. *Horm Behav* 41:384-395.

- O'Bryant EL, Wade J (2002b) Sexual dimorphism in neuromuscular junction size on a muscle used in courtship by green anole lizards. *J Neurobiol* 50:24-30.
- O'Keefe J, Nadel L (1978) *The Hippocampus as a Cognitive Map*. London: Oxford University Press.
- Olsson M, Madsen T (1998) Sexual selection and sperm competition in reptiles. En: *Sperm Competition and Sexual Selection* (Birkhead TR, Møller AP, eds), pp 503-578. Cambridge: Academic Press.
- Olsson M, Shine R, Wapstra E, Ujvari B, Madsen T (2002) Sexual dimorphism in lizard body shape: the roles of sexual selection and fecundity selection. *Evolution* 56:1538-1542.
- Orikasa C, Sakuma Y (2010) Estrogen configures sexual dimorphism in the preoptic area of C57BL/6J and ddN strains of mice. *J Comp Neurol* 518:3618-3629.
- Ormerod BK, Galea LAM (2001) Reproductive status influences cell proliferation and cell survival in the dentate gyrus of adult female meadow voles: a possible regulatory role for estradiol. *Neuroscience* 102:369-379.
- Ormerod BK, Lee TTY, Galea LAM (2003) Estradiol initially enhances but subsequently suppresses (via adrenal steroids) granule cell proliferation in the dentate gyrus of adult female rats. *J Neurobiol* 55:247-260.
- Ormerod BK, Galea LAM (2003) Reproductive status influences the survival of new cells in the dentate gyrus of adult male meadow voles. *Neurosci Lett* 346:25-28.
- Ormerod BK, Lee TTY, Galea LAM (2004) Estradiol enhances neurogenesis in the dentate gyri of adult male meadow voles by increasing the survival of young granule neurons. *Neuroscience* 128:645-654.
- Packard GC, Boardman TJ (1999) The use of percentages and size-specific indices to normalize physiological data for variation in body size: wasted time, wasted effort? *Comp Biochem Physiol A* 122:37-44.
- Pamidi N, Nayak S (2014) Effect of environmental enrichment exposure on neuronal morphology of streptozotocin-induced diabetic and stressed rat hippocampus. *Biomed J* 37:225-231.
- Parducz A, Garcia-Segura LM (1993) Sexual differences in the synaptic connectivity in the rat dentate gyrus. *Neurosci Lett* 161:53-56.
- Paredes MF, Sorrells SF, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2015) Brain size and limits to adult neurogenesis. *J Comp Neurol* doi: 10.1002/cne.23896.

- Patel SN, Clayton NS, Krebs JR (1997) Spatial learning induces neurogenesis in the avian brain. *Behav Brain Res* 89:115-128.
- Pawluski JL, Brummelte S, Barha CK, Crozier TM, Galea LAM (2009) Effects of steroid hormones on neurogenesis in the hippocampus of the adult female rodent during the estrous cycle, pregnancy, lactation and aging. *Front Neuroendocrinol* 30:343-357.
- Peña Y, Prunell M, Dimitsantos V, Nadal R, Escorihuela RM (2006) Environmental enrichment effects in social investigation in rats are gender dependent. *Behav Brain Res* 174:181-187.
- Peñafiel A, Gutiérrez A, Martín R, Pérez-Cañellas MM, De la Calle A (1996) A tangential neuronal migration in the olfactory bulbs of adult lizards. *NeuroReport* 7:1257-1260.
- Peñafiel A, Rivera A, Gutiérrez A, Trías S, De la Calle A (2001) Temperature affects adult neurogenesis in the lizard brain. *Int J Dev Biol* 45:S83-S84.
- Peretto P, Giachino C, Panzica G, Fasolo A (2001) Sexually dimorphic neurogenesis is topographically matched with the anterior accessory olfactory bulb of the adult rat. *Cell Tissue Res* 306:385-389.
- Perrot-Sinal TS, Kostenuik MA, Ossenkopp K-P, Kavaliers M (1996) Sex differences in performance in the Morris water maze and the effects of initial nonstationary hidden platform training. *Behav Neurosci* 110:1309-1320.
- Perrot-Sinal TS, Kavaliers M, Ossenkopp K-P (1998) Spatial learning and hippocampal volume in male deer mice: relations to age, testosterone and adrenal gland weight. *Neuroscience* 86:1089-1099.
- Perry G (1996) The evolution of sexual dimorphism in the lizard *Anolis polylepsis* (Iguania): evidence from intraspecific variation in foraging behavior and diet. *Can J Zool* 74:1238-1245.
- Perry G, Garland TJ (2002) Lizard home ranges revisited: effects of sex, body size, diet, habitat, and phylogeny. *Ecology* 83:1870-1885.
- Petreanu L, Alvarez-Buylla A (2002) Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci* 22:6106-6113.
- Pérez-Cañellas MM, García-Verdugo JM (1992) Adult neurogenesis in reptiles: a comparative study using [^3H]thymidine autoradiography. *Eur J Neurosci* 5:294.
- Pérez-Cañellas MM, García-Verdugo JM (1996) Adult neurogenesis in the telencephalon of a lizard: a [^3H]thymidine autoradiographic and bromodeoxyuridine immunocytochemical study. *Dev Brain Res* 93:49-61.

- Pérez-Cañellas MM, Font E, García-Verdugo JM (1997) Postnatal neurogenesis in the telencephalon of turtles: evidence for nonradial migration of new neurons from distant proliferative ventricular zones to the olfactory bulbs. *Dev Brain Res* 101:125-137.
- Pérez-Mellado V (1982) Algunos datos sobre la reproducción de dos especies de Lacertidae (Sauria, Reptilia) en el Sistema Central. *Bol R Soc Esp Hist Nat Secc Biol* 80:165-173.
- Pérez-Mellado V, Galindo-Villardón MP (1986) Sistemática de *Podarcis* (Sauria Lacertidae) Ibéricas y Norteafricanas mediante Técnicas Multidimensionales. Salamanca: Universidad de Salamanca.
- Pérez-Mellado V (1997) Genus *Podarcis*. En: Reptiles. Fauna Ibérica. Vol 10 (Salvador A, ed), pp 242-306. Madrid: Museo de Ciencias Naturales (CSIC).
- Pérez-Sánchez F, Molowny A, García-Verdugo JM, López-García C (1989) Postnatal neurogenesis in the nucleus sphericus of the lizard, *Podarcis hispanica*. *Neurosci Lett* 106:71-75.
- Phillips JB, Klukowski M (2008) Influence of season and adrenocorticotrophic hormone on corticosterone in free-living female eastern fence lizards (*Sceloporus undulatus*). *Copeia* 2008:570-578.
- Pianka ER, Vitt LJ (2003) Lizards: Windows to the Evolution of Diversity. Berkeley: University to California Press.
- Pierman S, Douhard Q, Balthazart J, Baum MJ, Bakker J (2006) Attraction thresholds and sex discrimination of urinary odorants in male and female aromatase knockout (ArKO) mice. *Horm Behav* 49:96-104.
- Pietras RJ, Moulton DG (1974) Hormonal influences on odor detection in rats: changes associated with the estrous cycle, pseudopregnancy, ovariectomy, and administration of testosterone propionate. *Physiol Behav* 12:475-491.
- Pinho C, Ferrand N, Harris DJ (2006) Reexamination of the Iberian and North African *Podarcis* (Squamata: Lacertidae) phylogeny based on increased mitochondrial DNA sequencing. *Mol Phylogenet Evol* 38:266-273.
- Pinho C, Harris DJ, Ferrand N (2007) Comparing patterns of nuclear and mitochondrial divergence in a cryptic species complex: the case of Iberian and North African wall lizards (*Podarcis*, Lacertidae). *Biol J Linn Soc* 91:121-133.
- Pinho C, Harris DJ, Ferrand N (2008) Non-equilibrium estimates of gene flow inferred from nuclear genealogies suggest that Iberian and North African wall lizards (*Podarcis* spp.) are an assemblage of incipient species. *BMC Evol Biol* 8:63.

- Platel R (1974) Poids encéphalique et indice d'encéphalisation chez les reptiles sauriens. *Zool Anz* 192:332-382.
- Platel R (1975) Encephalization and sex among Squamata. *Bull Soc Zool France* 100:621-631.
- Pompili A, Tomaz C, Arnone B, Tavares MC, Gasbarri A (2010) Working and reference memory across the estrous cycle of rat: a long-term study in gonadally intact females. *Behav Brain Res* 213:10-18.
- Powers JB, Winans SS (1975) Vomeronasal organ: critical role in mediating sexual behavior of the male hamster. *Science* 187:961-963.
- Pravosudov VV (2003) Long-term moderate elevation of corticosterone facilitates avian food-caching behaviour and enhances spatial memory. *Proc R Soc Lond B* 270:2599-2604.
- Pravosudov VV, Omanska A (2005) Prolonged moderate elevation of corticosterone does not affect hippocampal anatomy or cell proliferation rates in mountain chickadees (*Poecile gambeli*). *J Neurobiol* 62:82-91.
- Pravosudov VV (2006) On seasonality in food-storing behaviour in parids: do we know the whole story? *Anim Behav* 71:1455-1460.
- Pucek M (1965) Water content and seasonal changes of the brain-weight in shrews. *Acta Theriol* 10:353-367.
- Pyter LM, Reader BF, Nelson RJ (2005) Short photoperiods impair spatial learning and alter hippocampal dendritic morphology in adult male white-footed mice (*Peromyscus leucopus*). *J Neurosci* 25:4521-4526.
- Pyter LM, Trainor BC, Nelson RJ (2006) Testosterone and photoperiod interact to affect spatial learning and memory in adult male white-footed mice (*Peromyscus leucopus*). *Eur J Neurosci* 23:3056-3062.
- Quinn GP, Keough MJ (2002) *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Quintana L, Pouso P, Fabbiani G, Macadar O (2011a) A central pacemaker that underlies the production of seasonal and sexually dimorphic social signals: anatomical and electrophysiological aspects. *J Comp Physiol A* 197:75-88.
- Quintana L, Sierra F, Silva A, Macadar O (2011b) A central pacemaker that underlies the production of seasonal and sexually dimorphic social signals: functional aspects revealed by glutamate stimulation. *J Comp Physiol A* 197:211-225.

- Ramírez-Castillejo C, Nacher J, Molowny A, Ponsoda X, López-García C (2002) PSA-NCAM immunocytochemistry in the cerebral cortex and other telencephalic areas of the lizard *Podarcis hispanica*: differential expression during medial cortex neuronal regeneration. *J Comp Neurol* 453:145-156.
- Ramírez C, Nacher J, Molowny A, Sánchez-Sánchez F, Irurzun A, López-García C (1997) Photoperiod-temperature and neuroblast proliferation-migration in the adult lizard cortex. *NeuroReport* 8:2337-2342.
- Ramón y Cajal S (1913) Estudios sobre la Degeneración y Regeneración del Sistema Nervioso. Tomo 1: Degeneración y Regeneración de los Nervios. Tomo II: Degeneración y Regeneración de los Centros Nerviosos. Madrid: Moya.
- Rasika S, Nottebohm F, Alvarez-Buylla A (1994) Testosterone increases the recruitment and/or survival of new high vocal center neurons in adult female canaries. *PNAS* 91:7854-7858.
- Rauci F, Di Fiore MM, Pinelli C, D'Aniello B, Luongo L, Polese G, Rastogi RK (2006) Proliferative activity in the frog brain: a PCNA-immunohistochemistry analysis. *J Chem Neuroanat* 32:127-142.
- Reboreda JC, Clayton NS, Kacelnik A (1996) Species and sex differences in hippocampus size in parasitic and non-parasitic cowbirds. *NeuroReport* 7:505-508.
- Reiner A, *et al.* (2004) Revised nomenclature for avian telencephalon and some related brainstem nuclei. *J Comp Neurol* 473:377-414.
- Renoult JP, Geniez P, Bacquet P, Guillaume CP, Crochet P-A (2010) Systematics of the *Podarcis hispanicus*-complex (Sauria, Lacertidae) II: the valid name of the north-eastern Spanish form. *Zootaxa* 2500:58-68.
- Reynolds BA, Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707-1710.
- Rhen T, Crews D (2001) Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA in the brain and reproductive tissues of the leopard gecko, *Eublepharis macularius*. *J Comp Neurol* 437:385-397.
- Rochefort C, Gheusi G, Vincent J-D, Lledo P-M (2002) Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *J Neurosci* 22:2679-2689.

- Rodríguez F, López JC, Vargas JP, Broglio C, Gómez Y, Salas C (2002) Spatial memory and hippocampal pallium through vertebrate evolution: Insights from reptiles and teleost fish. *Brain Res Bull* 57:499-503.
- Romero LM (2004) Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *TREE* 19:249-255.
- Roof RL, Havens MD (1992) Testosterone improves maze performance and induces development of a male hippocampus in females. *Brain Res* 572:310-313.
- Roof RL (1993) The dentate gyrus is sexually dimorphic in prepubescent rats: testosterone plays a significant role. *Brain Res* 610:148-151.
- Rosen G, O'Bryant E, Matthews J, Zacharewski T, Wade J (2002) Distribution of androgen receptor mRNA expression and immunoreactivity in the brain of the green anole lizard. *J Neuroendocrinol* 14:19-28.
- Rosen GJ, Wade J (2001) Androgen metabolism in the brain of the green anole lizard (*Anolis carolinensis*): effects of sex and season. *Gen Comp Endocrinol* 122:40-47.
- Roth ED, Lutterschmidt WI, Wilson DA (2006) Relative medial and dorsal cortex volume in relation to sex differences in spatial ecology of a snake population. *Brain Behav Evol* 67:103-110.
- Rothstein SI, Yokel DA, Fleischer RC (1987) Social dominance, mating and spacing systems, female fecundity and vocal dialects in captive and free-ranging brown-headed cowbirds. En: *Current Ornithology*, vol. 3 (Johnston RF, ed), pp 127-185. New Jersey: Plenum.
- Ruiz CC, Wade J (2002) Sexual dimorphism in a copulatory neuromuscular system in the green anole lizard. *J Comp Neurol* 443:289-297.
- Salom S, Font C, Martínez-García F (1994) Seasonal sexually dimorphic distribution of neuropeptide Y-like immunoreactive neurons in the forebrain of the lizard *Podarcis hispanica*. *J Chem Neuroanat* 7:217-225.
- Sampedro C, Font E, Desfilis E (2008) Size variation and cell proliferation in chemosensory brain areas of a lizard (*Podarcis hispanica*): effects of sex and season. *Eur J Neurosci* 28:87-98.
- Schmidt C, Schmidt U (1980) Changes of olfactory sensitivity during the estrous cycle in female laboratory mice. *Chem Senses* 5:359-365.
- Schoenfeld TJ, Gould E (2012) Stress, stress hormones, and adult neurogenesis. *Exp Neurol* 233:12-21.

- Schubert SN, Houck LD, Feldhoff PW, Feldhoff RC, Woodley SK (2006) Effects of androgens on behavioral and vomeronasal responses to chemosensory cues in male terrestrial salamanders (*Plethodon shermani*). *Horm Behav* 50:469-476.
- Schulz RL (1969) Zur postnatalen Biomorphose des Ependyms im Telencephalon von *Lacerta agilis agilis*. *Z Mikrosk-anat Forsch* 81:111-152.
- Schwenk K (1993) The evolution of chemoreception in squamate reptiles: a phylogenetic approach. *Brain Behav Evol* 41:124-137.
- Schwenk K (1995) Of tongues and noses: chemoreception in lizards and snakes. *Trends Ecol Evol* 10:7-12.
- Scott DM, Ankney CD (1983) The laying cycle of brown-headed cowbirds: Passerine chickens? *Auk* 100:583-592.
- Scoville WB, Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20:11-21.
- Segovia S, Guillamón A (1982) Effects of sex steroids on the development of the vomeronasal organ in the rat. *Dev Brain Res* 5:209-212.
- Segovia S, Orensanz LM, Valencia A, Guillamón A (1984) Effects of sex steroids on the development of the accessory olfactory bulb in the rat: a volumetric study. *Dev Brain Res* 16:312-314.
- Segovia S, Guillamón A (1993) Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway and sex differences in reproductive behaviors. *Brain Res Rev* 18:51-74.
- Segovia S, García-Falguera A, Carrillo B, Collado P, Pinos H, Pérez-Laso C, Vinader-Caerols C, Beyer C, Guillamón A (2006) Sexual dimorphism in the vomeronasal system of the rabbit. *Brain Res* 1102:52-62.
- Seri B, García-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2004) Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neurol* 478:359-378.
- Sever DM (1989) Caudal hedonic glands in salamanders of the *Eurycea bislineata* complex (Amphibia: Plethodontidae). *Herpetologica* 45:322-339.
- Shapiro LE, Leonard CM, Sessions CE, Dewsbury DA, Insel TR (1991) Comparative neuroanatomy of the sexually dimorphic hypothalamus in monogamous and polygamous voles. *Brain Res* 541:232-240.

- Sharp PJ (2005) Photoperiodic regulation of seasonal breeding in birds. *Ann N Y Acad Sci* 1040:189-199.
- Sheridan M, Tamarin RH (1988) Space use, longevity, and reproductive success in meadow voles. *Behav Ecol Sociobiol* 22:85-90.
- Sherry DF, Vaccarino AL (1989) Hippocampus and memory for food caches in black-capped chickadees. *Behav Neurosci* 103:308-318.
- Sherry DF, Vaccarino AL, Buckenham K, Herz RS (1989) The hippocampal complex of food-storing birds. *Brain Behav Evol* 34:308-317.
- Sherry DF, Jacobs LF, Gaulin SJ (1992) Spatial memory and adaptive specialization of the hippocampus. *Trends Neurosci* 15:298-303.
- Sherry DF, Forbes MRL, Khurgel M, Ivy GO (1993) Females have a larger hippocampus than males in the brood-parasitic brown-headed cowbird. *PNAS* 90:7839-7843.
- Sherry DF, Galef BG, Clark MC (1996) Sex and intrauterine position influence the size of the gerbil hippocampus. *Physiol Behav* 60:1491-1494.
- Sherry DF, Hoshoooley JS (2007) Neurobiology of spatial behavior. En: *The Ecology and Behavior of Chickadees and Titmice: An Integrated Approach* (Otter KA, ed), pp 1-352. Oxford: Oxford University Press.
- Sherry DF, Hoshoooley JS (2009) The seasonal hippocampus of food-storing birds. *Behav Proc* 80:334-338.
- Sherry DF, Hoshoooley JS (2010) Seasonal hippocampal plasticity in food-storing birds. *Phil Trans R Soc B* 365:933-943.
- Shettleworth SJ, Hampton RR, Westwood RP (1995) Effects of season and photoperiod on food storing by black-capped chickadees, *Parus atricapillus*. *Anim Behav* 49:989-998.
- Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E (2001) Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410:372-376.
- Simerly RB (2002) Wired for reproduction: organization and development of sexually dimorphic circuits in the mammalian forebrain. *Annu Rev Neurosci* 25:507-536.
- Simon CA (1983) A review of lizard chemoreception. En: *Lizard Ecology: Studies of a Model Organism* (Huey RB, Pianka ER, Schoener TW, eds), pp 119-133. Cambridge, MA: Harvard University Press.

- Smith GT, Brenowitz EA, Wingfield JC, Baptista LF (1995) Seasonal changes in song nuclei and song behavior in Gambel's white-crowned sparrows. *J Neurobiol* 28:114-125.
- Smith GT (1996) Seasonal plasticity in the song nuclei of wild rufous-sided towhees. *Brain Res* 734:79-85.
- Smith GT, Brenowitz EA, Beecher MD, Wingfield JC (1997a) Seasonal changes in testosterone, neural attributes of song control nuclei, and song structure in wild songbirds. *J Neurosci* 17:6001-6010.
- Smith GT, Brenowitz EA, Wingfield JC (1997b) Seasonal changes in the size of the avian song control nucleus HVC defined by multiple histological markers. *J Comp Neurol* 381:253-261.
- Smith GT, Brenowitz EA, Wingfield JC (1997c) Roles of photoperiod and testosterone in seasonal plasticity of the avian song control system. *J Neurobiol* 32:426-442.
- Smith MT, Pencea V, Wang Z, Luskin MB, Insel TR (2001) Increased number of BrdU-labeled neurons in the rostral migratory stream of the estrous prairie vole. *Horm Behav* 39:11-21.
- Smith TE, Gordon SJ (2002) Sex differences in olfactory communication in *Saguinus labiatus*. *Int J Primatol* 23:429-441.
- Smulders TV, Sasson AD, DeVoogd TJ (1995) Seasonal variation in hippocampal volume in a food-storing bird, the black-capped chickadee. *J Neurobiol* 27:15-25.
- Smulders TV, Shiflett MW, Sperling AJ, DeVoogd TJ (2000) Seasonal changes in neuron numbers in the hippocampal formation of a food-hoarding bird: the black-capped chickadee. *J Neurobiol* 44:414-422.
- Soma KK, Hartman VN, Wingfield JC, Brenowitz EA (1999) Seasonal changes in androgen receptor immunoreactivity in the song nucleus HVC of a wild bird. *J Comp Neurol* 409:224-236.
- Soma KK, Tramontin AD, Featherstone J, Brenowitz EA (2004) Estrogen contributes to seasonal plasticity of the adult avian song control system. *J Neurobiol* 58:413-422.
- Sorwell KG, Wesson DW, Baum MJ (2008) Sexually dimorphic enhancement by estradiol of male urinary odor detection thresholds in mice. *Behav Neurosci* 122:788-793.
- Spritzer MD, Galea LAM (2007) Testosterone and dihydrotestosterone, but not estradiol, enhance survival of new hippocampal neurons in adult male rats. *Dev Neurobiol* 67:1321-1333.

- Spritzer MD, Daviau ED, Coneeny MK, Engelman SM, Prince WT, Rodriguez-Wisdom KN (2011) Effects of testosterone on spatial learning and memory in adult male rats. *Horm Behav* 59:484-496.
- Squire LR (2009) Memory and brain systems: 1969-2009. *J Neurosci* 29:12711-12716.
- Steele LJ, Cooper WE (1997) Investigation of pheromonal discrimination between conspecific individuals by male and female leopard geckos (*Eublepharis macularis*). *Herpetologica* 53:475-484.
- Stephan H, Frahm H, Baron G (1981) New and revised data on volumes of brain structures in insectivores and primates. *Folia Primatol (Basel)* 35:1-29.
- Stoll CJ, Voorn P (1985) The distribution of hypothalamic and extrahypothalamic vasotocinergic cells and fibers in the brain of a lizard, *Gekko gekko*: presence of a sex difference. *J Comp Neurol* 239:193-204.
- Striedter GF (2005) *Principles of Brain Evolution*. Sunderland, MA: Sinauer.
- Suárez R, Mpodozis J (2009) Heterogeneities of size and sexual dimorphism between the subdomains of the lateral-innervated accessory olfactory bulb (AOB) of *Octodon degus* (Rodentia: Hystricognathi). *Behav Brain Res* 198:306-312.
- Tai FD, Wang TZ, Zhang YH, Sun RY (2004) Sexual dimorphism of the vomeronasal organ and the accessory olfactory bulb of the mandarin vole *Microtus mandarinus* and the reed vole *M. fortis*. *Acta Theriol* 49:33-42.
- Takami S, Urano A (1984) The volume of the toad medial amygdala-anterior preoptic complex is sexually dimorphic and seasonally variable. *Neurosci Lett* 44:253-258.
- Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, Gould E (1999) Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci* 19:5792-5801.
- Tanapat P, Hastings NB, Rydel TA, Galea LAM, Gould E (2001) Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism. *J Comp Neurol* 437:496-504.
- Tanapat P, Hastings NB, Gould E (2005) Ovarian steroids influence cell proliferation in the dentate gyrus of the adult female rat in a dose- and time- dependent manner. *J Comp Neurol* 481:252-265.
- Thompson CK, Bentley GE, Brenowitz EA (2007) Rapid seasonal-like regression of the adult avian song control system. *PNAS* 104:15520-15525.

- Thompson DC (1977) Reproductive behavior of the grey squirrel. *Can J Zool* 55:1176-1184.
- Thompson DC (1978) The social system of the grey squirrel. *Behaviour* 64:305-328.
- Thompson DC, Thompson PS (1980) Food habits and caching behavior of urban grey squirrels. *Can J Zool* 58:701-710.
- Thorpe WH (1958) The learning of song patterns by birds, with especial references to the song of the chaffinch, *Fringilla coelebs*. *Ibis* 100:535-570.
- Tokarz RR (1987) Effects of corticosterone treatment on male aggressive behavior in a lizard (*Anolis sagrei*). *Horm Behav* 21:358-370.
- Tokarz RR (1995) Mate choice in lizards: a review. *Herpetol Monograph* 9:17-40.
- Tokarz RR, McMann S, Seitz L, John-Alder H (1998) Plasma corticosterone and testosterone levels during the annual reproductive cycle of male brown anoles (*Anolis sagrei*). *Physiol Zool* 71:139-146.
- Tokarz RR, McMann S, Smith LC, John-Alder H (2002) Effects of testosterone treatment and season on the frequency of dewlap extensions during male-male interactions in the lizard *Anolis sagrei*. *Horm Behav* 41:70-79.
- Touhara K, Vosshall LB (2009) Sensing odorants and pheromones with chemosensory receptors. *Annu Rev Physiol* 71:307-332.
- Tramontin AD, Smith GT, Breuner CW, Brenowitz EA (1998) Seasonal plasticity and sexual dimorphism in the avian song control system: stereological measurement of neuron density and number. *J Comp Neurol* 396:186-192.
- Tramontin AD, Brenowitz EA (1999) A field study of seasonal neuronal incorporation into the song control system of a songbird that lacks adult song learning. *J Neurobiol* 40:316-326.
- Tramontin AD, Brenowitz EA (2000) Seasonal plasticity in the adult brain. *Trends Neurosci* 23:251-258.
- Tramontin AD, Wingfield JC, Brenowitz EA (2003) Androgens and estrogens induce seasonal-like growth of song nuclei in the adult songbird brain. *J Neurobiol* 57:130-140.
- Van Damme R, Castilla AM (1996) Chemosensory predator recognition in the lizard *Podarcis hispanica*: effects of predation pressure relaxation. *J Chem Ecol* 22:13-22.
- van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH (1999a) Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *PNAS* 96:13427-13431.

- van Praag H, Kempermann G, Gage FH (1999b) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature Neurosci* 2:266-270.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH (2000) Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Neurosci Rev* 1:191-198.
- VanderWall SB, Beck MJ, Briggs JS, Roth JK, Thayer TC, Hollander JL, Armstrong JM (2003) Interspecific variation in the olfactory abilities of granivorous rodents. *J Mammalogy* 84:487-496.
- Vidal-Pizarro I, Swain GP, Selzer ME (2004) Cell proliferation in the lamprey central nervous system. *J Comp Neurol* 469:298-310.
- Voigt T (1989) Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes. *J Comp Neurol* 289:74-88.
- Wade J, Crews D (1991) The relationship between reproductive state and "sexually" dimorphic brain areas in sexually reproducing and parthenogenetic whiptail lizards. *J Comp Neurol* 309:507-514.
- Wade J, Crews D (1992) Sexual dimorphisms in the soma size of neurons in the brain of whiptail lizards (*Cnemidophorus* species). *Brain Res* 594:311-314.
- Wade J (1998) Sexual dimorphisms in the brainstem of the green anole lizard. *Brain Behav Evol* 52:46-54.
- Wade J, Arnold AP (2004) Sexual differentiation of the zebra finch song system. *Ann N Y Acad Sci* 1016:540-559.
- Wade J (2012) Sculpting reproductive circuits: relationships among hormones, morphology and behavior in anole lizards. *Gen Comp Endocrinol* 176:456-460.
- Waters P, Woodley SK, Baum MJ (2005) Sex difference in the distribution and size of glomeruli in the ferret's main olfactory bulb. *Neurosci Lett* 381:237-241.
- Weiler E, Farbman AI (1997) Proliferation in the rat olfactory epithelium: age-dependent changes. *J Neurosci* 17:3610-3622.
- Weiler E, McCulloch MA, Farbman AI (1999) Proliferation in the vomeronasal organ of the rat during postnatal development. *Eur J Neurosci* 11:700-711.
- Weruaga E, Briñón JG, Porteros A, Arévalo R, Aijón J, Alonso JR (2001) A sexually dimorphic group of atypical glomeruli in the mouse olfactory bulb. *Chem Senses* 26:7-15.

- Wesson DW, Keller M, Douhard Q, Baum MJ, Bakker J (2006) Enhanced urinary odor discrimination in female aromatase knockout (ArKO) mice. *Horm Behav* 49:580-586.
- Whittier JM, Tokarz RR (1992) Physiological regulation of sexual behavior in female reptiles. En: *Biology of the Reptilia*. Vol. 18. Physiology E. Hormones, Brain, and Behavior (Gans C, Crews D, eds), pp 24-69. Chicago: University of Chicago Press.
- Williams RW, Herrup K (1988) The control of neuron number. *Annu Rev Neurosci* 11:423-453.
- Wilson BS, Wingfield JC (1994) Seasonal and interpopulational variation in plasma levels of corticosterone in the side-blotched lizard (*Uta stansburiana*). *Physiol Zool* 67:1025-1049.
- Wingfield J, Silverin B (1986) Effects of corticosterone on territorial behavior of free-living male song sparrows *Melospiza melodia*. *Horm Behav* 20:405-417.
- Wingfield JC, Hunt K, Breuner C, Dunlap K, Fowler GS, Freed L, Lepson J (1997) Environmental stress, field endocrinology, and conservation biology. En: *Behavioral Approaches to Conservation in the Wild* (Clemmons JR, Buchholz R, eds), pp 95-131. New York: Cambridge University Press.
- Woodley SK, Moore MC (2002) Plasma corticosterone response to an acute stressor varies according to reproductive condition in female tree lizards (*Urosaurus ornatus*). *Gen Comp Endocrinol* 128:143-148.
- Woodley SK (2007) Sex steroid hormones and sexual dimorphism of chemosensory structures in a terrestrial salamander (*Plethodon shermani*). *Brain Res* 1138:95-103.
- Wyatt TD (2014) *Pheromones and Animal Behavior. Chemical Signals and Signatures*. New York: Cambridge University Press.
- Yanes-Méndez C, Martín-Trujillo JM, Pérez-Batista MA, Monzón-Mayor M, Marrero A (1988) Ependymogenesis of the lizard basal areas. II. Sulcus. *Z Mikrosk-anat Forsch* 102:573-589.
- Yanes C, Monzón-Mayor M, Ghandour MS, De Barry J, Gombos G (1990) Radial glia and astrocytes in developing and adult telencephalon of the lizard *Gallotia galloti* as revealed by immunohistochemistry with anti-GFAP and anti-vimentin antibodies. *J Comp Neurol* 295:559-568.
- Yaskin VA (1984) Seasonal changes in brain morphology in small mammals. En: *Winter Ecology of Small Mammals, Special Publications of the Carnegie Museum of Natural History* (Merritt JF, ed), pp 183-191. Pittsburgh: Carnegie Museum of Natural History.
- Yaskin VA (1994) Variation in the brain morphology of the common shrew. En: *Advances in the Biology of Shrews, Vol. 118. Special Publication Carnegie Museum of Natural History*

(Merritt JF, Kirkland Jr GL, Rose RK, eds), pp 155-161. Pittsburgh: Carnegie Museum of Natural History.

Young LJ, Wang Z (2004) The neurobiology of pair bonding. *Nat Neurosci* 7:1048-1054.

Zikopoulos B, Kentouri M, Dermon CR (2001) Cell genesis in the hypothalamus is associated to the sexual phase of a hermaphrodite teleost. *NeuroReport* 12:2477-2481.

Zupanc GKH, Horschke I, Ott R, Rascher GB (1996) Postembryonic development of the cerebellum in gymnotiform fish. *J Comp Neurol* 370:443-464.

Zupanc GKH, Hinsch K, Gage FH (2005) Proliferation, migration, neuronal differentiation, and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain. *J Comp Neurol* 488:290-319.



Directores:

Enrique Font Bisier

Unidad de Etología – Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva

Ester Desfilis Barceló

Departament de Medicina Experimental. Universitat de Lleida.



Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva
Facultad de Biología