

COORDINACION DE SERVICIOS
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



**EFFECTO DE LA DESMASCULINIZACIÓN NEONATAL SOBRE LA
REGULACIÓN DE LA CONDUCTA SEXUAL EN RATAS MACHO**

ADULTAS

CBS

227412

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias Biológicas

PRESENTA

M. EN C. F. ADRIANA MORALES OTAL

DIRECTOR DE TESIS: DR. JAVIER VELÁZQUEZ MOCTEZUMA

MAYO DEL 2002

“El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo PFP-20-93

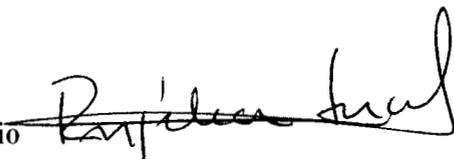
**El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud
de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco
aprobó la tesis que presentó**

M. en C. F. Adriana Morales Otal

El día 20 de mayo del 2002

Comité Tutorial


Tutor : Dr. Javier Velázquez Moctezuma

Asesor : Dra. Rosa Angélica Lucio Lucio 

Asesor : Dr. Raúl Paredes Guerrero 

Sinodal : Dr. Héctor Ponce Monter 

Sinodal : Dr. Rubén Román Ramos 

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

¿Cómo que sí puedo? Para el que cree todo es posible.

A Papá y Mamá, por que ellos son mi vida y mi motor para seguir adelante. Por todos los valores que me han inculcado y por que por ellos existo. Los quiero mucho.

A Mine, Bere, César Augusto, por todo lo que me han brindado, por su apoyo, comprensión y gran cariño, los quiero mucho.

A mi cosita

Por ser tan maravilloso conmigo, por todo el gran amor, paciencia, ternura y apoyo que me ha regalado y por que eres mi cosita adorada, Te AMO.

A Ricardo y César

Esos angelitos que llenan mi vida de luz, sonrisas y de paz.

A todos aquellos que compartieron momentos de alegría y tristeza, de triunfos y fracasos, por su amistad sin interés.

GRACIAS

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer sinceramente y de todo corazón al Dr. Javier Velázquez Moctezuma eminente y reconocido investigador, que ha sido mi ángel de la guarda, por “darme la oportunidad” y apoyo incondicional a lo largo de este estudio en instalaciones, consejos, sugerencias, correcciones, regaños y estímulo. Además de brindarme su invaluable amistad, de la cual me siento muy honrada.

Gracias por todo DOC.

A los miembros del Comité Tutorial: Dra. Rosa Angélica Lucio Lucio y al Dr. Raúl Paredes Guerrero por el valioso tiempo que le dedicaron en la revisión de esta tesis, por sus acertados comentarios, sugerencias, recomendaciones y paciencia. Por haber compartido conmigo sus conocimientos y su experiencia en mi formación profesional.

Al Dr. Rubén Román Ramos y al Dr. Héctor Ponce Monter, sus atinadas sugerencias y correcciones en la revisión de esta tesis.

Deseo expresar mi más sincera gratitud al Dr. Armando Ferreira Nuño, por su apoyo incondicional, por las sugerencias, comentarios, consejos, correcciones, paciencia, compañía, tiempo y ansiedades, en la realización de esta tesis, siempre con mucho cariño. Muchísimas gracias Profesor.

A mis amigos Geraldine, Sandra, Diana, Susi, Rosalía, Doris, Sigfrido, Lolis por todo su apoyo, por echarme porras cuando ya no podía, por que siempre tuvieron una palabra de aliento, por que han creído en mi y por los momentos tan agradables que hemos pasado juntos.

A todos mis amigos fuera del laboratorio.

A la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, por que es mi casa. Al área de Neurociencias y su bioterio, al laboratorio de Neurohistología, por todo lo compartido.

ABREVIATURAS

5-HT:	serotonina
5-HT_{1A}:	receptor serotoninérgico
8OHDPAT:	8 hidroxil 2(di-n-propilamino)tetralina
AMPc:	adenosina monofosfato cíclico
APM:	área preóptica media
APO:	apomorfin
ARNm:	ácido ribonucleico mensajero
CON:	control
CSF:	conducta sexual femenina
CSH:	conducta sexual heterotípica
CSM:	conducta sexual masculina
D_n:	día postnatal (n)
DA:	dopamina
DAG:	diacilglicerol
DES:	dietilestilbestrol
DNA:	ácido desoxirribonucleico
E₂:	estradiol
E_n:	día (n) de la gestación
EE:	error estándar
FE:	frecuencia de eyaculación
GMPc:	guanosina monofosfato cíclico
i.p:	intraperitonealmente
IP(3).	fosfatidilinositol
LC:	locus coeruleus
LH:	hormona luteinizante
LI:	latencia de intromisión
LM:	latencia de monta
LQ:	coeficiente de lordosis
M₁:	receptor muscarínico
ME:	macho estímulo, entrenado para montar vigorosamente
min:	minutos
mseg:	milisegundo
NE:	no eyaculó
NI:	número de intromisión
NM:	número de monta
NS:	no hubo diferencias significativas
NSD-APM:	núcleo dimórfico sexual del área preóptica media
OXO:	oxotremorina
s.c:	subcutáneo
seg:	segundos
SNC:	sistema nervioso central
Ss:	sujetos
SsE:	sujetos experimentales
T:	testosterona
TA:	tasa de aciertos
TP:	propionato de testosterona
Tx:	tamoxifén
x²:	Chi cuadrada
YH:	yohimbina
α₂:	receptor noradrenérgico

ÍNDICE

	Página
1. Resumen	1
2. Summary	3
3. Introducción	5
3.1 Diferenciación del sistema nervioso central	6
3.1.1 Sexo genético y sexo hormonal	7
3.1.2 Períodos críticos y tipos de diferenciación sexual	9
3.2 Mecanismos de acción de los esteroides gonadales en el sistema nervioso	11
3.2.1 La aromatización proceso fundamental en la diferenciación sexual	13
3.3 Efectos organizacionales y activacionales de los esteroides gonadales	15
3.3.1 Mecanismos genómicos y no genómicos de las hormonas esteroides en el proceso de diferenciación sexual	16
3.4 Estructuras cerebrales sexualmente dimórficas	19
3.4.1 Dimorfismo sexual en el área preóptica media de mamíferos	21
3.5 Núcleo dimórfico sexual del área preóptica	22
3.5.1 Manipulaciones farmacológicas y hormonales sobre la diferenciación sexual del núcleo dimórfico sexual del área preóptica del hipotálamo anterior	25
3.6 Efecto de la administración neonatal del Tamoxifén sobre la regulación de la conducta sexual masculina	26
3.7 Dimorfismo sexual en el aprendizaje	28

	Página
3.8 Diferenciación sexual y sistemas de neurotransmisión	30
3.9 Conducta sexual masculina en ratas	
3.9.1 Descripción de los patrones generales	37
3.9.2 Patrones copulatorios de la conducta sexual masculina	40
3.9.3 Componentes de la Conducta Sexual Masculina	41
4. Planteamiento del problema	43
5. Hipótesis	44
6. Objetivos	45
7. Materiales y Métodos	46
8. Análisis estadístico	54
9. Resultados	55
10. Discusión	83
11. Conclusión	101
12. Referencias	103
13. Anexo	131

1. RESUMEN

La diferenciación sexual es un proceso regulado por múltiples factores, entre los que destacan las hormonas secretadas por las gónadas durante periodos críticos del desarrollo. La administración de hormonas en el período perinatal deterioraran permanentemente la conducta sexual de los sujetos. En ratas, la administración de tamoxifén (Tx), un fármaco con acciones antiestrogénicas, es capaz de desmasculinizar y feminizar la conducta sexual de los machos.

Por otro lado, existen fármacos que actúan selectivamente sobre un sistema de neurotransmisión, estimulando la conducta sexual masculina. En este estudio, machos a los que se les administró neonatalmente dos dosis de Tx (12.5 ó 100 $\mu\text{g} / \text{kg}$) para inducir su desmasculinización, en la etapa adulta se les evaluó la conducta sexual masculina y bajo el efecto de drogas que estimulan esta conducta como yohimbina (YH), antagonista noradrenérgico de los receptores α_2 , 8 hidroxí-2-(di-n-propilamino)tetralina (8-OHDPAT), agonista serotoninérgico de los receptores 5HT_{1A} , apomorfina (APO), agonista dopaminérgico de los receptores D_2 , y oxotremorina (OXO), agonista colinérgico de los receptores M_1 . Se corroboró que la administración subcutánea de ambas dosis de tamoxifén, durante la etapa neonatal en ratas macho, provoca el deterioro completo de la conducta copulatoria, al incrementar las latencias de monta, intromisión, eyaculación así como el número de montas e intromisiones y provocar la disminución significativa de la frecuencia de eyaculación y del porcentaje de sujetos sexualmente activos. Ninguna de las drogas empleadas para estimular la CSM, restablecieron completamente dicha conducta. No obstante, con la administración de YH y de 8-OHDPAT se pudo estimular parcialmente la conducta sexual masculina, probablemente porque actuaron sobre los sistemas de neurotransmisión menos afectados por el

tamoxifén. En cambio, la administración de APO y OXO tuvo un efecto nulo sobre los parámetros copulatorios deteriorados por la administración neonatal de tamoxifén.

Estos datos sugieren que la administración de ambos esquemas de Tx probablemente dañan severamente a los sistemas colinérgico y dopaminérgico, mientras que altera parcialmente al sistema serotoninérgico y adrenérgico. Se concluye que la desmasculinización y feminización que provoca la administración neonatal de Tx, no puede ser revertida por la administración de las drogas que se emplearon y que se sabe facilitan esta conducta en ratas machos adultos normales.

2. SUMMARY

Sexual behavior during adulthood largely depends upon hormonal events that take place around birth. Administration of the antiestrogen Tamoxifen (Tx) to males immediately after birth induces a marked decrease of masculine sexual behavior during adulthood. On the other hand, it is well known that masculine sexual behavior can be stimulated by the administration of specific drugs acting on the adrenergic, cholinergic, serotonergic and dopaminergic systems. In this study, male rats were neonatally treated with two doses of Tx (12.5 or 100 $\mu\text{g} / \text{kg}$) in order to induce demasculinization. During adulthood their masculine sexual behavior was analyzed both, spontaneously and after the administration of drugs that stimulate masculine sexual behavior. Neonatal administration of Tx induced clear impairments of masculine sexual behavior during adulthood, like longer mount (ML), intromission (IL), and ejaculation latency (EL), increased number of mounts (NM) and intromission (NI), decreased ejaculatory frequency (EF) and percentage of sexually active males. Administration of oxotremorine (a cholinergic muscarinic agonist, M_1), 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT, a serotonergic 5-HT_{1A} receptor blocker), yohimbine (an α_2 -adrenergic blocker) and apomorphine (a dopaminergic agonist D_2) were unable to fully restore masculine sexual behavior in demasculinized males. Only slight improvements of some behavioral parameters were observed with 8-OH-DPAT and yohimbine. Oxotremorine seems to induce a worsening of sexual behavior impairments. Results obtained with apomorphine were not significantly different from saline controls. Data suggest that neonatal treatment with both doses of Tx induces permanent impairments of the neural circuitry regulating masculine sexual behavior not only limited to morphological changes but also

functional alterations of the neurotransmitter systems, like cholinergic and dopaminergic systems principally and partially the serotonergic and adrenergic systems.

3. INTRODUCCIÓN

El dimorfismo sexual es un proceso fundamental para la reproducción y preservación de las especies. La diferenciación sexual en los mamíferos involucra diversos aspectos anatómicos, fisiológicos y conductuales que incluyen diferencias morfológicas de las características sexuales primarias y secundarias, diferencias en conductas reproductivas y no reproductivas, así como diferencias estructurales y ultraestructurales a nivel del sistema nervioso central (SNC).

Muchas especies muestran diferencias sexuales en estructuras del SNC que participan en el control de las funciones endocrinas y conductuales, que son parte de los procesos reproductivos y que incluyen patrones motores durante el apareamiento. Las diferencias sexuales en el SNC son el resultado de varios factores, entre los que destacan las hormonas secretadas por las gónadas durante periodos críticos del desarrollo que ocurren perinatalmente (Neil y cols. 1981).

Se ha mostrado que varias regiones del SNC presentan diferencias estructurales y funcionales entre hembras y machos. Estas diferencias se refieren al tamaño del soma neuronal (Pfaff, 1966; Dörner y Staudt 1968, 1969a), la morfología y extensión dendrítica, los patrones de proyecciones axonales (De Vries, 1984), la organización sináptica en el cerebro (Kawata, 1994), la médula espinal, los ganglios autonómicos periféricos en diferentes especies (Breedlove y Arnold, 1980), entre las que se incluye al ser humano (McLusky y Naftolin, 1981).

Entre las estructuras del SNC, el área preóptica media (APM) presenta diferencias entre machos y hembras: en cuanto al contenido de receptores (Nett y cols. 1999), número de neuronas, expresión de genes (Paredes y cols. 1998), funciones y conductas reproductoras

(Kantha y Ramakrishna, 1996), observándose además que esta área responde a las hormonas gonadales (Tagaki y Kawashima, 1993). La organización dimórfica del APM, esta determinada por los esteroides gonadales, y participa importantemente en el desarrollo de la conducta sexual masculina durante la edad adulta (Kantha y Ramakrishna, 1996). Además, se ha descrito que las hormonas esteroides modulan la expresión de los neurotransmisores, induciendo cambios estructurales en el tejido nervioso (Kawata y cols, 1994).

Estos antecedentes permiten proponer que las hormonas participan en el establecimiento y manifestaciones del dimorfismo sexual, siendo estas acciones probablemente reguladas por los diferentes sistemas de neurotransmisión.

3.1 DIFERENCIACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Los trabajos iniciales realizados en vertebrados pusieron de manifiesto, por primera vez, la relación entre las hormonas gonadales y la diferenciación del fenotipo. En concreto se descubrió que, independientemente del sexo genético, era posible modificar el fenotipo sexual en el pollo mediante la administración de hormonas esteroides durante la etapa embrionaria (Dantchakoff, 1935; Willier y cols. 1935; Wolff y Gimplinger, 1935a, 1935b).

En 1936, Pfeiffer mostró en la rata, que la ausencia de testículos durante el período perinatal, ocasionaba en la etapa adulta la aparición del patrón cíclico de secreción de hormonas gonadotróficas del hipotálamo, que es propio de la hembra, y que la exposición a las secreciones testiculares durante el mismo período bloqueaba la aparición de ese patrón.

Esto significa que la presencia o ausencia de testículos funcionales capaces de secretar testosterona (T) perinatalmente, determina la aparición de un patrón endocrino femenino, independientemente de que la cría fuese genéticamente macho o hembra. Más tarde, Dantchakoff (1938) comunicó que la aparición de una conducta sexual masculina (CSM) en el cobayo, era dependiente de los andrógenos testiculares, ya que la exposición del cobayo hembra a la acción de estas hormonas durante el período prenatal, producía cuando el animal era adulto, un patrón de CSM.

En la década de los cincuenta aparecen en la investigación sobre diferenciación sexual del sistema nervioso y la conducta preguntas fundamentales; y al mismo tiempo, una serie de autores inician investigaciones para determinar con precisión las dosis de T necesarias para provocar experimentalmente que la hembra adquiriera características masculinas propias del macho; y su período crítico u óptimo de administración.

3.1.1 SEXO GENÉTICO Y SEXO HORMONAL

El sexo cromosómico de un individuo se establece en el momento de la concepción, con la aportación por el espermatozoide de un cromosoma X o uno Y. El cromosoma determina si la gónada embrionaria se diferenciará hacia ovario o testículo. El embrión que se desarrolla como hembra presenta dos cromosomas X (**XX**). El embrión macho presenta un cromosoma X y un cromosoma Y (**XY**).

En 1953, Jost demostró que la administración de testosterona exógena a un embrión hembra o a un macho gonadectomizado, provocaba el desarrollo de los conductos de Wolff, que posteriormente dan origen al tracto genital masculino y la regresión de los conductos de

Müller, que originarían el tracto genital femenino. Este mismo autor, en 1961 concluyó que es la presencia del cromosoma **Y** (embriones XO se desarrollan como hembra, Jost, 1972) lo que determina la formación de testículos funcionales, a partir del ovotestis indiferenciado, capaces de secretar andrógenos. Siendo los andrógenos los responsables de la diferenciación hacia macho (Jost, 1972).

La función del cromosoma **Y** es cambiar el plan de desarrollo de las células precursoras, presentes en las gónadas indiferenciadas, para que en vez de desarrollarse como células foliculares lo hagan como células de Sertoli (Wilson y cols. 1981a). Todas las características sexualmente dimórficas, incluyendo las del desarrollo del cerebro, dependen de la presencia de uno o más genes en el brazo corto del cromosoma **Y**. El gen que codifica para el factor determinante del testículo (FDT), condiciona la forma de la gónada. Una exploración detallada del brazo corto del cromosoma **Y**, condujo al descubrimiento de un gen candidato a ser el FDT. Un gen equivalente está presente en el cromosoma **Y** de todos los mamíferos estudiados hasta ahora y codifica para un RNA mensajero (mRNA) que se expresa específicamente en los testículos (Wilson y cols. 1981a).

El gen denominado región del cromosoma **Y** determinante del sexo (*SRY*), codifica para una proteína que tiene un dominio de unión al DNA, lo que sugiere que actúa como un factor de transcripción (Koopman y cols. 1991). El gen *SRY* determina que la gónada indiferenciada se convierta en testículo. Los sucesos que acontecerán a continuación durante la diferenciación sexual, se determinan por los factores secretados por las células del testículo fetal. Por el contrario, el fenotipo femenino se puede desarrollar en ausencia de cualquier tejido gonadal (Wilson y cols. 1981a).

3.1.2 PERÍODOS CRÍTICOS Y TIPOS DE DIFERENCIACIÓN SEXUAL

Barraclough y Leathen (1954) en ratón, y Barraclough (1961) en rata, encontraron que la administración de 1.25 mg de propionato de testosterona (TP) en la hembra neonata era suficiente para que presentara pospuberalmente anovulación y estro vaginal continuo.

Esta es la dosis experimental de propionato de testosterona que ocasiona mayores efectos sobre la hembra; ya que las características femeninas pueden modificarse a masculinas. Si es administrada durante los últimos días de la vida fetal (vía madre gestante) hasta los primeros días de vida postnatal, pueden adquirir características masculinas. Mientras que si se administra a partir del día cinco de vida hasta el día diez, sus efectos decrecen significativamente (Swanson y Van Der Werff, 1965; Brown-Grant, 1974).

Si la testosterona está presente en el plasma sanguíneo durante ese período crítico (o exógena, por su administración en la hembra o en el macho gonadectomizado), el animal es permanentemente masculinizado y desfeminizado.

El término **masculinización** se refiere a la organización y permanente facilitación de las características de macho, como es la expresión del patrón copulatorio. El término **desfeminización** hace referencia a la ausencia de las características femeninas (ciclicidad gonadotrófica y presentación de conducta lordótica durante la cópula).

Estos hechos indican que en realidad no es posible hablar de un período crítico, sino de varios relacionados con los distintos efectos de los esteroides gonadales sobre el sistema nervioso y la conducta. Incluso es más correcto pensar en términos de períodos de máxima susceptibilidad, para la acción de estas hormonas sobre los tejidos que están involucrados en el control de procesos conductuales sexodimórficos (Goy y McEwen, 1980).

Goy y McEwen (1980), sugieren que la diferenciación sexual presenta tres modos o tipos de dimorfismo:

1. Tipo I. Requiere la acción de organización de las hormonas gonadales en edad temprana y del efecto de su activación en la edad adulta (la conducta sexual es un claro ejemplo de este tipo de diferenciación).

2. Tipo II. Requiere exclusivamente la acción de activación, no siendo necesaria la acción de organización durante la etapa temprana del desarrollo (por ejemplo, la conducta de bostezo en el mono *Rhesus*, es más frecuente en el macho adulto que en la hembra y que en los monos jóvenes de ambos sexos). Sin embargo, la frecuencia de aparición de esta conducta en la hembra y en los jóvenes puede ser llevada a los mismos niveles presentados por el macho adulto si se administra testosterona (Segovia y Guillamón, 1988).

3. Tipo III. Referida a conductas que para su expresión sólo requieren de la presencia de la hormona gonadal durante el desarrollo temprano. Por ejemplo, el juego juvenil del mono *Rhesus* macho y los patrones de micción que se observan en el perro, dependen sólo de la acción organizadora de la T.

Esta diversidad de acción de las hormonas esteroides (masculinización, desfeminización, desmasculinización o pérdida de las características propias del macho; diferenciación de tipos I, II y III) sugiere que pueden influir de forma independiente (o al menos diferente) sobre distintos procesos de desarrollo y diferenciación nerviosa. Un ejemplo experimental, además de los ya mencionados, que sustenta este señalamiento, fue realizado por Christensen y Gorski (1978), quienes implantaron T y/o estradiol (E_2) en la región preóptica y en el núcleo ventromedial del hipotálamo de ratas hembras. Los resultados que obtuvieron fueron los siguientes: 1) la implantación de T en la región preóptica en el segundo

día postnatal (D_2), indujo un incremento en la expresión de la CSM cuando la hembra es adulta (masculinización); 2) la implantación de T o E_2 en el núcleo ventromedial del hipotálamo en el D_2 ó D_5 , ocasionaba la pérdida del patrón cíclico de secreción de gonadotrofinas y supresión de la lordosis cuando la hembra es adulto (desfeminización). Estos datos indican la existencia de complejas relaciones entre el periodo de máxima susceptibilidad, la hormona administrada, la estructura nerviosa implicada, los patrones conductuales y hormonales afectados.

3.2 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ESTEROIDES GONADALES EN EL SISTEMA NERVIOSO

Durante la década de los sesenta, uno de los descubrimientos más sorprendentes fue que la administración de E_2 a la hembra neonata mimetizaba los efectos de la administración de T durante el mismo período (Gorski y Wagner, 1965). ¿Podía el esteroide gonadal femenino causar el efecto de diferenciación hacia macho que producía la testosterona?

La respuesta surgió de las características específicas de las rutas metabólicas de la testosterona. Esta hormona es metabolizada en el mismo sistema nervioso por algunos procesos enzimáticos fundamentales: el de la reducción y el de la aromatización. La primera de estas rutas metabólicas reduce la testosterona en dihidrotestosterona (DHT); la segunda metaboliza la T en E_2 (Rhoda y cols. 1984). La actividad de la enzima 5- α -reductasa se ha encontrado principalmente en el hipotálamo, la hipófisis anterior, la amígdala, el hipocampo, el cerebelo y la corteza cerebral, durante el período fetal en diversas especies, incluida la humana (Martini, 1978). Sin embargo, también se ha encontrado actividad aromatizante en el

área preóptica del hipotálamo y la amígdala (Roselli y Resko, 1987). En la actualidad se admite que el E₂ es el responsable último de la diferenciación sexual hacia macho, metabolizado desde la testosterona.

Otras evidencias apoyan esta tesis: 1) los metabolitos de los estrógenos en el cerebro (los catecolestrógenos) ocasionan desfeminización en la rata hembra si se administran en el D₁ (Parvizi y Naftolin, 1977); 2) la DHT es menos efectiva que la misma T o el E₂ en la inducción de desfeminización en el cerebro de rata neonata, y 3) los efectos del tratamiento con T observados en ratas hembra neonatas pueden ser bloqueados por antagonistas de los estrógenos (McLusky y Naftolin, 1981).

Si los estrógenos son responsables de la diferenciación sexual por metabolización de la T, ¿por qué no se defeminiza y/o masculiniza la hembra normal?. Tanto las ratas machos como las hembras, tienen altos niveles plasmáticos de estrógenos durante el período postnatal temprano (Weisz y Gunsalus, 1973). La respuesta a esta paradoja ha surgido del descubrimiento de la existencia de una proteína plasmática denominada α -feto-proteína (AFP), captadora de estrógenos en el plasma (Núñez y cols. 1971; Raynaud y cols. 1971).

Esta proteína está presente en plasma en altas concentraciones durante el último período de la gestación y desaparece gradualmente durante las primeras semanas de la vida postnatal. Su función es captar y secuestrar gran parte de los estrógenos presentes de la circulación fetal y neonatal, evitando en la hembra una posible desfeminización y masculinización causada por los estrógenos maternos y por los secretados por su propio ovario. La AFP, presente en ambos sexos, pudiera tener funciones neurobiológicas más allá de la de protección de la desfeminización y la masculinización de la hembra neonata, actuando

como neuromodulador del transporte intraneuronal de E_2 , regulando las concentraciones intraneuronales de esa misma hormona o actuando como un factor trófico *per se* (Toran-Allerand, 1984).

3.2.1 LA AROMATIZACIÓN PROCESO FUNDAMENTAL EN LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL

En la rata macho, las secreciones testiculares durante los períodos críticos participan importantemente en la diferenciación del cerebro y la activación de la conducta sexual masculina, la cual esta determinada por la T (Roselli y Klosterman, 1998). La diferenciación sexual del cerebro involucra dos procesos: masculinización y desfeminización (Beach, 1975).

Se ha mostrado que la desfeminización del cerebro se debe a la conversión de T a 17β -Estradiol (E_2). A este proceso se le llamo aromatización (Rhoda y cols. 1984). En ratas macho adultas, los estrógenos derivados de la aromatización de T por la aromatasa P-450 promueven el desarrollo de los patrones masculinos en el SNC (Register y cols. 1995; Roselli y Resko, 2001).

En el área preóptica media se encuentran receptores a estrógenos los cuales participan en la regulación de la conducta copulatoria de la rata macho (Clancy y cols. 2000).

El implante de inhibidores de la aromatasa en el APM bloquea la conducta copulatoria de ratas macho inexpertos (Clancy y cols. 1995) sugiriendo que el mecanismo por el cual se da esta conducta esta determinada por la conversión de T a E_2 . El tratamiento con antiestrógenos bloquea la T que estimula la conducta copulatoria (Bonsall y cols. 1991).

Altos niveles de actividad de aromatasa se han encontrado en el área preóptica del hipotálamo y en el núcleo dimórfico sexual del área preóptica media (NDS-APM, Roselli y Resko, 1987). Esta actividad también es alta en otros núcleos dimórficos sexuales del área límbica, los cuales tienen conexiones aferentes y eferentes con el APM (Roselli y cols. 1996).

Estos núcleos incluyen al núcleo de la amígdala cortical y al núcleo de la amígdala media, núcleo de la cama del estría terminal, área preóptica periventricular, hipotálamo anterior y núcleo ventromedial del hipotálamo, todos estos núcleos muestran un incremento a la inmunoreactividad del *c-fos* después de la cópula (Baum y Everitt, 1992).

Los andrógenos incrementan notablemente la actividad de la aromatasa en el núcleo de la cama del estría terminal, núcleo del área preóptica media, área preóptica periventricular, hipotálamo anterior y núcleo ventromedial, mientras que en la amígdala las neuronas que expresan una alta actividad de la aromatasa no está regulada por los andrógenos (Roselli y cols. 1985). La actividad hipotalámica y la actividad de la enzima es mayor en los machos que en las hembras debido a que las concentraciones de andrógenos circulantes son diferentes (Steimer y Hutchison, 1990).

Roselli y Resko, han propuesto que existen dos tipos diferentes de enzimas aromatasas en el cerebro de la rata. Una es independiente de la regulación hormonal y se encuentra en la amígdala corticomedia en bajas concentraciones. La otra está regulada por los andrógenos, en grandes concentraciones y se encuentra en el núcleo del área preóptica media que participa en la regulación de la conducta copulatoria (Lephart y cols. 2001). Estos investigadores sugieren que los estrógenos actúan regulando la sensibilidad a los andrógenos, al modificar la duración del receptor a andrógenos en su sitio de unión (Roselli y Resko, 1993).

Otros estudios utilizando primates como modelo en los que evaluaron la formación de estrógenos *in situ* en cerebro, sugieren la importancia de la aromatasa no sólo en los procesos de reproducción, sino también en las funciones nerviosas tales como la memoria y aprendizaje que están reguladas por los estrógenos (Roselli y Resko, 2001).

3.3 EFECTOS ORGANIZACIONALES Y ACTIVACIONALES DE LOS ESTEROIDES GONADALES

Al final de la década de los 50's y durante la década de los 60's, se empezó a manifestar la importancia que tiene la acción de los esteroides gonadales durante el periodo perinatal, para que las conductas reproductivas se desplieguen en la vida adulta. Se pudo comprobar que ratas macho recién nacidas y gonadectomizadas, exhibían en la edad adulta, conductas típicas de la hembra tras ser tratados con estrógenos y progesterona (Whalen y Edwards, 1966) y que ratas macho gonadectomizadas el D₁ e inyectadas subcutáneamente con 0.02 mg de propionato de testosterona en el D₃, presentaban en la edad adulta, conducta sexual heterotípica (Dörner y Hinz, 1967). Estos trabajos reforzaron los primeros hallazgos de Phoenix y cols. en 1959, realizados en cobayo, los cuales demostraron que la administración de propionato de testosterona, durante la edad prenatal, provocaba la aparición en las hembras adultas, de estereotipos conductuales masculinos, con más probabilidad que los femeninos correspondientes a su sexo genético (Phoenix y cols. 1959). Tales resultados, llevaron a estos investigadores a preguntarse cuál sería la forma de actuar de los esteroides gonadales para que, en época prenatal temprana, su acción sobre el sistema nervioso fuera tal que, en estado adulto, las conductas reproductivas típicas de cada sexo puedan ser expresadas. Phoenix y cols. sugieren que los esteroides sexuales fundamentalmente actúan de dos maneras:

“**organizando**” en el período temprano del desarrollo las vías nerviosas responsables de las conductas reproductoras, siendo sus efectos permanentes e irreversibles, y “**activando**” esas vías nerviosas ya organizadas, cuando el organismo es adulto, para que las conductas que dichas vías controlan puedan ser inducidas.

Investigadores y neuroendocrinólogos han identificado diferencias sexuales en la morfología, estructura y neuroquímica del cerebro, sin embargo muchas de estas diferencias desaparecen cuando el macho o la hembra son sometidos a condiciones endocrinas similares (si son gonadectomizados o tratados con dosis similares de esteroides), de tal forma que estas diferencias parecen estar determinadas por un efecto activacional durante la edad adulta. Estas investigaciones han revelado que muchos aspectos morfológicos y químicos del cerebro; están determinados en la edad adulta y son regulados por la activación en el SNC, para que durante esta etapa se lleve a cabo dicha conducta (Balthazart y cols. 1996).

3.3.1 MECANISMOS GENÓMICOS Y NO GENÓMICOS DE LAS HORMONAS ESTEROIDES EN EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN SEXUAL

Los mecanismos celulares y moleculares por los que las hormonas gonadales, a través de sus receptores, “organizan” las diferencias entre los sexos que aparecen en estado adulto en la morfología del SNC y en la conducta, no se han esclarecido. Se sabe, que los receptores de las hormonas gonadales pueden inducir efectos neuronales que aparentemente duran horas hasta días. Estos efectos involucran la unión de los esteroides a sus receptores nucleares. La activación de estos receptores facilita la interacción del complejo hormona-receptor con el genoma, llevando a cabo la transcripción del ARNm y dando como resultado la síntesis de

proteínas (Sutter-Dub. 2002), lo que se denominó acción genómica (McEwen. 1988). Esto significa, que esta sucesión de eventos intracelulares dan como resultado cambios en la fosforilación de proteínas y alteraciones en la transcripción del DNA modificando, por tanto la síntesis de ARNm y de proteínas (Beato. 1989).

Atendiendo a lo anteriormente expuesto, es entonces saber como la presencia de estrógenos a través de este mecanismo es capaz de masculinizar estructuras nerviosas sexodimórficas como el: órgano vomeronasal, bulbo olfatorio accesorio, núcleo del tracto olfatorio accesorio, núcleo de la cama del estría terminal anterior, núcleo dimórfico sexual del área preóptica media, amígdala media, núcleo ventromedial, núcleo espinal del bulbo cavernoso y núcleo dorsolateral (Segovia y Guillamón, 1997); que en estado adulto presentan en el macho valores mayores del número de neuronas que las hembras. Los experimentos de Toran-Allerand pusieron de manifiesto en estudios *in vitro*, que la presencia de estradiol y de testosterona estimulan el crecimiento neurítico y que además, éste es específico en distintas regiones. De tal modo que se ha propuesto que una mayor supervivencia neuronal sería la responsable de que el macho presentará en estado adulto un mayor número de neuronas que la hembra (Torand-Allerand. 1980) y que esta diferenciación sexual estara determinada por la aromatización de T a estradiol (Vinader-Caerols y cols. 2000).

Durante el desarrollo ocurre que en el sistema nervioso de forma generalizada proliferan muchas más neuronas de las que luego en realidad sobreviven. Se ha especulado que son aquellas neuronas que no logran hacer sinapsis, las que finalmente mueren siendo este mecanismo, el que finalmente ajusta la población más adecuada para cada estructura dependiendo de su función (Oppenheim, 1991). Este fenómeno de mortalidad celular masiva no es un proceso necrótico que responda a una deficiencia en la homeostasis celular, sino que

más bien responde a un mecanismo que la célula pone en marcha cuando las condiciones no son las óptimas para sobrevivir, bien por ausencia de factores neurotróficos (Mahalik y Owens, 1997) o por errores en la sinapsi (Harms y cols. 2001). Se le denominó por ello muerte genéticamente programada, debido a que este fenómeno pone en marcha un mecanismo que implica síntesis de proteínas que activarán el próximo grupo de genes específicos (Graham y Chen, 2001) relacionados con la mortalidad neuronal (Dragunow y Preston, 1995).

Fue Kerr, en 1973 el que acuñó el término "apoptosis" para referirse a este proceso, estableciendo las características morfológicas del mismo (Kerr y Searle, 1973 y cols. 1994).

Los efectos de los esteroides sexuales en el SNC pueden inducir cambios de latencias breves (mseg) en la excitación de las neuronas. Las características temporales de estas respuestas excluyen la participación de la síntesis de proteínas. Así estas respuestas deben involucrar la acción directa de niveles membranales que alteran la conductancia iónica, la respuesta a Ca^{2+} , proteínas G y Ras, AMPc, GMPc, IP(3), DAG, fosfodiesterasas, proteínas cinasas, tirosinas cinasas, cinasas al receptor de estrógenos y óxido nítrico sintetasa (Sutter-Dub, 2002). De tal forma que los estrógenos pueden ejercer sus efectos por mecanismos no genómicos a nivel membranal (Balthazart y cols. 2001).

3.4 ESTRUCTURAS CEREBRALES SEXUALMENTE DIMÓRFICAS

Las diferencias sexuales en el SNC son el resultado de varios factores: anatómicos, estructurales, conexiones nerviosas, hormonales, bioquímicas, metabolismo de neurotransmisores; durante periodos críticos del desarrollo. Así, varias estructuras del área preóptica anterior que presentan diferencias entre machos y hembras, responden a la acción de las hormonas esteroides gonadales (Tagaki y Kawashima, 1993), que al parecer modulan la expresión de los neurotransmisores, induciendo cambios estructurales en el tejido nervioso (Kawata y cols. 1994).

Primero provocan la diferenciación estructural necesaria en todos los sistemas que participan en la reproducción (incluyendo al SNC) y posteriormente en la edad adulta actúan sobre el funcionamiento género-específico de estos sistemas. Durante el desarrollo, los esteroides gonadales dan lugar a un macho o una hembra que da lugar a dos diferentes conductas (Trevor, 1996).

La existencia de diferencias sexuales en estructuras del SNC, se ha determinado por diversos experimentos realizados en la rata (Peiffer, 1936). Tales estudios mostraron que el patrón masculino de secreción de gonadotrofinas en el adulto, depende de la liberación de hormonas producidas por el testículo durante la etapa perinatal. Estas diferencias funcionales existen porque el medio ambiente hormonal del macho adulto, es diferente al de la hembra adulta. Algunas funciones del cerebro, pueden ser sexualmente dimórficas, tales como: la liberación de hormonas gonadotróficas de la hipófisis, la conducta sexual femenina o masculina, entre otras (Harlan y cols. 1979).

Las conductas reproductoras son sexodimórficas, es decir, respuestas estereotipadas a un mismo estímulo tanto en machos como en hembras de una misma especie, y que difieren cualitativa y cuantitativamente. De este modo, se sugirió que, las estructuras que controlan estas conductas, deberían expresar dimorfismo sexual en diferentes parámetros morfológicos, y si así ocurría, podría ser que los cambios permanentes se manifestarán en estas conductas sexodimórficas en estado adulto, tras la manipulación hormonal en época perinatal, se correspondieran también con cambios en las estructuras que las controlan. Los primeros estudios en el APM y en el núcleo del hipotálamo ventromedial, estructuras implicadas en las conductas reproductoras, así lo corroboran.

Los estudios de Dörner y Staudt (1968, 1969a y b), indican que las ratas hembras presentan, en estado adulto, núcleos celulares mayores tanto en el APM como en el núcleo del hipotálamo ventromedial, y que la gonadectomía del macho en el D₁ hace que el tamaño de los núcleos se incremente hasta presentar valores similares a los presentados por las hembras en ambas estructuras. Otras investigaciones llevadas a cabo en esta región del APM revelaron la existencia, de un núcleo densamente poblado de neuronas, de mayor volumen en el macho que en la hembra, al cual le nombraron núcleo dimórfico sexual del área preóptica (NDS-APM, Gorski y cols. 1978).

3.4.1 DIMORFISMO SEXUAL EN EL ÁREA PREÓPTICA MEDIA DE MAMÍFEROS

El APM está implicada en la fisiología y conducta reproductiva (Pfaff y Schwartz-Giblin, 1988; Sachs y Meisel, 1988). Las neuronas de esta región tienen receptores a andrógenos y estrógenos (Pfaff y Keiner, 1973).

El APM se localiza entre la porción caudal del quiasma óptico y comisura anterior, tiene como borde rostral y caudal a la lámina terminal y la división media del núcleo de la cama de la estría terminal, respectivamente. El APM forma conexiones con varias regiones cerebrales, recibe entradas del sistema vomeronasal, directamente del órgano vomeronasal (Larriva-Sahd y cols. 1993) a través de la estría terminal hacia la amígdala media y al núcleo de la cama de la estría terminal anterior y medial posterior, respectivamente (De Olmos y cols. 1985). Debido a estas conexiones se ha implicado en la regulación de funciones y conductas sexodimórficas relacionadas con la reproducción: control de la conducta copulatoria en el macho y conducta copulatoria y liberación cíclica de gonadotropinas (Sachs y Meisel, 1988), liberación de prolactina, sed hipovolémica (Chiba y Murata, 1985), así como la conducta materna en la hembra (Numan, 1988).

Dörner y Staudt (1968) fueron los primeros en encontrar diferencias entre machos y hembras en el APM, en cuanto al volumen del núcleo del área preóptica media del hipotálamo anterior. En ratas hembras el volumen nuclear es mayor en machos, pero los orquidectomizados al D₁ incrementan su volumen nuclear que pueden ser contrarrestado por la administración de TP al D₃.

3.5 NÚCLEO DIMÓRFICO SEXUAL DEL ÁREA PREÓPTICA

Gorski y colaboradores encontraron dimorfismo sexual en un pequeño grupo de células del APM (Gorski y cols. 1978, 1980). El desarrollo de este núcleo empieza después de la vida fetal (Jacobson y cols. 1981) y depende principalmente del medio hormonal durante el periodo de diferenciación sexual. A este grupo de células se le llamó **núcleo dimórfico sexual del área preóptica** (NDS-APM) y presenta parámetros de diferenciación: 1) el volumen celular es 3 veces mayor en la rata macho que en la hembra. 2) el macho presenta neuronas más grandes que la hembra y 3) la proporción de neuronas aferentes y eferentes o densidad neuronal, es mayor en el macho que en la hembra, principalmente en un núcleo que corresponde a la parte central del núcleo preóptico medial. Recientemente, se han descrito en el APM tres divisiones citoarquitectónicas: la parte central del núcleo preóptico medial, la anteroventral y la parte media del núcleo preóptico medial. Además el núcleo medial anteroventral está presente en los machos pero ausente en las hembras (Bloch y Gorski, 1988).

El NDS-APM ha sido extensamente utilizado en los últimos años, como modelo para estudiar los mecanismos de la acción hormonal durante la diferenciación sexual (Döhler y cols. 1984b), presenta un periodo prenatal sensible a hormonas que comienza el día 18 de gestación (E₁₈) y finaliza postnatalmente en el D₅ (Rhees y cols. 1990); posteriormente Davis y cols. han sugerido que este período puede extenderse hasta el D₂₉ postnatal (Davis y cols. 1995). La castración del macho en el D₁ disminuye el volumen del NDS-APM (Gorski y cols. 1978), efecto que puede ser revertido con la inyección de propionato de testosterona en el D₂ (Jacobson y cols. 1981), o administrándolo diariamente los días D₂, D₃, D₄, y D₅ (Rhees y cols. 1990).

Estos experimentos ponen de manifiesto que los andrógenos actúan perinatalmente en la masculinización del NDS-APM (Davis y cols. 1995). Sin embargo, diversas evidencias permiten suponer que la masculinización del NDS-APM depende de la acción de los estrógenos, más que de los andrógenos. Así, se ha mostrado que el tratamiento perinatal con el antiestrógeno tamoxifén (Tx) en machos a una dosis de 100 µg/kg disminuye el volumen del NDS-APM hasta un tamaño semejante al de la hembra (Döhler y cols. 1983, 1986); mientras que el tratamiento de hembras pre y postnatalmente con el estrógeno sintético dietilestilbestrol (DES), incrementa el volumen del NDS-APM (Döhler y cols. 1984a; Ohe, 1994). Además, cuando un inhibidor de la aromatasa como el fradozole (CGS16949A) se administra a crías macho durante la etapa gestacional, así como postnatalmente desde el D₁ al D₁₄ y son sacrificados en el D₃, se observa una disminución del área NDS-APM, similar al tamaño que tiene esta área en las hembras (Ohe, 1994).

El mecanismo de diferenciación sexual del NDS-APM no ha sido esclarecido. Sin embargo existen estudios que apoyan que los esteroides gonadales participan en la regulación de la neurogénesis perinatal del desarrollo de este núcleo. Davis y cols. 1996, mostraron la importancia de la muerte celular en el desarrollo del dimorfismo sexual de este núcleo. Encontrando que existe un incremento significativo de apoptosis en los núcleos de las hembras (Arai y cols. 1996) comparado con el NDS-APM de los machos. De tal modo que se sugirió que la regulación de la apoptosis por T es uno de los mecanismos que participan en la diferenciación sexual del NDS-APM (Davis y cols. 1996).

Las ratas macho nacidas de madres que durante la gestación fueron expuestas a situaciones de estrés, presentan niveles plasmáticos menores de T, menor actividad sexual y una disminución del volumen del NDS-APM en edad adulta versus los machos cuyas madres

no sufrieron estrés durante la gestación (Anderson y cols. 1986). Las alteraciones endocrinas y conductuales, observadas en machos cuyas madres padecieron estrés durante la gestación, están reguladas por cambios estructurales en el sistema nervioso, al alterarse el sentido de la diferenciación sexual del mismo. La desmasculinización en varios núcleos dimórficos (NDS-APM, amígdala media, núcleo espinal del bulbo cavernoso y núcleo espinal dorsolateral), puede deberse al estrés prenatal durante los periodos críticos en los cuales estas estructuras cerebrales son más sensibles a la T (Kerchner y cols. 1995) y a los estrógenos (Hsu y cols. 2001).

Trabajos realizados con la técnica de trasplante nervioso, apoyan estas sugerencias: el trasplante del APM de machos neonatos a hembras de la misma edad, induce un incremento en la aparición de la CSM en estas hembras cuando son adultas (Arendash y Gorski, 1982).

Se ha descrito que, cuando se lesiona bilateralmente el NDS-APM de ratas macho adultas sexualmente inexpertas, se disminuye el número de animales que eyaculan y se incrementan las latencias de monta, intromisión y eyaculación (De Jonge, 1989). Sin embargo, lesiones en el NDS-APM en ratas macho adultas sexualmente expertas no deterioran su conducta sexual (Arendash y Gorski, 1983).

Por otro lado, lesiones mayores en el APM que afectan al NDS-APM, inducen lordosis en ratas macho tratadas con estrógenos y progesterona. Esto sugiere que el APM está relacionada con la inhibición tónica de la lordosis en machos (Turkenburg y cols. 1988).

Otros estudios han mostrado que en la rata adulta, las evaluaciones de la conducta sexual masculina dan como resultado un incremento significativo en la conducta sexual al

adquirir experiencia y se observa un aumento en el volumen del NSD-APM (Prince y cols. 1998).

3.5.1 MANIPULACIONES FARMACOLÓGICAS Y HORMONALES SOBRE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL DEL NDS-APM

Otras investigaciones que han estudiado las bases de la diferenciación sexual, han utilizado manipulaciones farmacológicas y hormonales que interfieren con la acción del receptor a estrógeno y o en la unión de la hormona o en el metabolismo. El uso del Tx ha sido una herramienta de gran valor para determinar la importancia del estrógeno en la diferenciación sexual (Döhler y cols. 1984c, 1986). El Tx produce respuestas biológicas las cuales pueden ser estrogénicas o antiestrogénicas, dependiendo del tejido sobre el cual se lleve a cabo la acción (Mathews y Arnold, 1991; Lonard y Smith, 2002; Pinilla y cols. 2002).

Existen trabajos que sugieren, que la acción del estrógeno a través del receptor a estrógenos masculiniza el cerebro. Recientemente, McCarthy y cols. (1993), han empleado un método de biología molecular en el cual han utilizado un oligodesoxinucleótido anti-sentido al receptor a estrógenos y al ARNm durante el período crítico de diferenciación sexual, intentando interrumpir la síntesis y función del receptor a estrógenos. El uso de esta técnica en varios cultivos celulares (Uhlmann y Peyman, 1990; Eck y Nabel, 1991) incluyendo el cerebro (McCarthy y cols. 1992) ha mostrado la eficacia de este oligodesoxinucleótido antisentido al bloquear el blanco de la síntesis de proteínas e interferir con su funcionamiento.

Se encontró que la administración de este oligodesoxinucleótido antisentido en el D₃ a hembras, modifica permanente el volumen del NDS-APM y del núcleo paraestrial. Todos

estos experimentos muestran que la conversión de estrógenos a partir de andrógenos tienen una función muy importante en el desarrollo del dimorfismo sexual del NDS-APM, y que la actividad de la aromatasa durante el periodo perinatal es necesaria en el proceso de diferenciación (Veney y cols. 2000).

Döhler y cols. (1984c) han mostrado que a ratas hembras recién nacidas tratadas con Tx presentan menor volumen del NDS-APM (50%) que las hembras control, además de esterilidad anovulatoria. Así, el patrón morfológico del NDS-APM de hembras requiere de alguna exposición a estrógenos (Döhler y cols. 1984c). De este modo, los estrógenos son necesarios para el desarrollo del NDS-APM de machos y hembras (Döhler y cols. 1984c, 1993, Lund y cols. 2001).

3.6 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN NEONATAL DEL TAMOXIFÉN SOBRE LA REGULACIÓN DE LA CONDUCTA SEXUAL MASCULINA

El tamoxifén (Tx) es un inhibidor competitivo de la unión de estradiol a los receptores de estrógeno. Se utiliza como terapia del cáncer de mama (Marshall, 1994; Howell, 2001; Pritchard, 2001), enfermedades trombolíticas, retinopatías y carcinoma endometrial (Cuzick y cols. 1993; Higa, 1994). Las propiedades antiestrogénicas del Tx están basadas en estudios en los cuales se mostró la inhibición del estradiol que induce sobre la cornificación vaginal y sobre el útero de rata (Harper y Walpole, 1966), además de suprimir la fertilidad y potencia copulatoria de ratas macho adultas (Gill-Sharma y cols. 1993, 2001a, b y c).

El Tx está relacionado estructuralmente con el estrógeno sintético DES, compuesto que produce criptorquidia, retención de los conductos de Müller y otras alteraciones en el tracto reproductor de ratón (Bullock y cols. 1988).

Utilizando modelos en los cuales se ha utilizado ratas macho, administrando Tx y DES perinatalmente a una dosis de 100µg/kg, se encontró que inducen lesiones similares en el tracto genital, aspermia, hipogonadismo y criptorquidia (Bullock y cols. 1988; Iguchi y Ohta, 1995). Se ha determinado también que la administración de Tx a ratas macho adultas, produce una disminución del peso de los testículos, órganos sexuales secundarios, desorganización de la citoarquitectura de los túbulos seminíferos y disminución de la movilidad espermática (Gill-Sharma, 1993, 2001a,b).

En las ratas macho adultas el tratamiento neonatal de Tx y DES disminuyen la CSM (Döhler, 1991; Csaba y cols. 1986, Csaba y Karabélyos, 2001).

Vancutsem y cols. 1997, observaron en ratas macho recién nacidas, alteraciones en el NDS-APM y en el APM, producidas por la administración de Tx a partir del día D₁ al D₅ de nacidos, caracterizando los cambios en el día postnatal D₆, valorando el número y diferenciación de neuronas de esas estructuras. El Tx disminuyó la forma, volumen y número de neuronas en el NDS-APM (Döhler y cols. 1991, Vancutsem y Roessler, 1997).

La reducción del volumen se ha asociado con la inhibición de la CSM (Döhler y cols. 1991, Lephart y cols. 2001). Durante el desarrollo, los estrógenos son necesarios para masculinizar el NDS-APM. Vancutsem y cols. (1997) sugirieron que la disminución del volumen, podría ser interpretado como un efecto desmasculinizante del Tx, el cual tiene alteraciones sobre la conducta sexual del adulto. Así, la administración perinatal de Tx y DES

produce lesiones del tracto reproductor y disminuye la conducta sexual de roedores macho (Döhler y cols. 1991; Csaba y cols. 1986, 2001; Gill-Sharma y cols. 2001a; Iguchi y Ohta, 1995; Bullock y cols. 1988).

3.7 DIMORFISMO SEXUAL EN EL APRENDIZAJE

Las conductas sexualmente dimórficas están reguladas por los efectos organizadores y activadores de las hormonas gonadales, aunque su participación varía dependiendo del tipo de conducta. En relación a las diferencias sexuales en el aprendizaje y los efectos de los esteroides sexuales, poco se ha descrito acerca de cuales de estos efectos, regulan el aprendizaje.

Algunas de las investigaciones han indicado que, las diferencias sexodimórficas dependen del efecto de los esteroides gonadales durante etapas tempranas del desarrollo (Segovia y Guillamón, 1988).

El enfoque actual sobre la diferenciación sexual de la conducta surgió de un importante trabajo del grupo de Phoenix (1959), quienes estudiaron el efecto de la conducta sexual de cobayos machos y hembras, cuyas madres hubieran sido androgenizadas con propionato de testosterona durante la mayor parte de la gestación. Las hembras cuando llegaban a adultas, no presentaban el reflejo lordótico necesario para la cópula al ser estimuladas. Además, cuando se les administró T mostraron la conducta de monta típica del macho. En tanto que, los machos no presentaron ningún tipo de anormalidad en la conducta. Con estos resultados concluyeron que, durante la época prenatal los andrógenos ejercen una acción *diferenciadora* de las

estructuras del sistema nervioso que controlan la conducta copulatoria del macho. En época adulta, la T *activa* las mencionadas estructuras para que se exprese la conducta sexual.

Posteriormente, otros estudios demostraron que la acción diferenciadora de los andrógenos puede ser también postnatal, o producirse perinatalmente (Phoenix y cols. 1959).

En varias especies de mamíferos, se ha podido observar la existencia de dimorfismo sexual no sólo en la conducta copulatoria, sino también en otros tipos de conducta como la agresión, el juego, los niveles de actividad, la ingesta de comida y la regulación del peso corporal, la preferencia por sabores dulces o salados, la emisión de feromonas, la forma de marcar el territorio, la reactividad a choques eléctricos y distintas tareas de aprendizaje (Goy y McEwen, 1980; Sánchez-Santed y cols. 1993).

Los experimentos que muestran la existencia de diferencias sexuales se clasifican en dos categorías, establecidas a partir del reforzamiento utilizado.

a) tareas de condicionamiento: en las que la emisión de la respuesta adecuada por parte del animal tiene como consecuencia la obtención de un estímulo reforzante positivo (agua o comida), y cuyo resultado es la adquisición de una respuesta apetitiva de aproximación al reforzamiento (Campbell y cols. 1971).

b) aprendizaje aversivo: incluye tareas de condicionamiento en las que se utilizan reforzadores negativos como choque eléctrico. El resultado de este tipo de condicionamiento es la adquisición de una respuesta de evitación del reforzamiento (choque), siendo tal evitación el acontecimiento reforzante (Segovia y Guillamón, 1988).

El aprendizaje discriminativo, en lo que al dimorfismo sexual se refiere, es el de discriminación espacial, en el que, en ausencia de estímulos diferenciales externos, como luces o sonidos, el sujeto debe aprender a realizar un recorrido en un laberinto, o bien elegir una

misma posición (Calés y cols. 1992). En este tipo de discriminación, se ha mostrado que, utilizando tanto laberintos simples en forma de *X*, *Y* o *T* (Wong y Judd, 1973) como complejos (Stewart y cols. 1975), la rata macho presenta un menor número de errores que la hembra.

Los estudios en los cuales se han utilizado estos modelos, han mostrado que la administración neonatal a machos del antiandrógeno (acetato de ciproterona) que actúa intracelularmente compitiendo por los receptores a andrógenos y del antiestrógeno Tx, en una dosis de 12.5µg a partir del D₁ al D₈, que actúa inhibiendo la unión del receptor a los estrógenos; y la androgenización neonatal de las hembras con TP, invierten las tareas de aprendizaje de machos y hembras, masculinizando la ejecución de las hembras y feminizando la de los machos. Por lo tanto, estos estudios muestran que el aprendizaje es sexodimórfico y puede ser organizado neonatalmente por el estradiol, a través de la aromatización de testosterona (Patchev y cols. 1995).

3.8 DIFERENCIACIÓN SEXUAL Y SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN

Las hormonas gonadales activan la conducta sexual mediante un efecto local en las estructuras del sistema nervioso. Esta acción se realiza como parte del funcionamiento normal de las neuronas y modula la interacción entre ellas. Ello, de hecho, supone la interacción entre las hormonas gonadales y los neurotransmisores que actúan como mediadores químicos en la comunicación interneuronal.

Existen evidencias que sugieren que los neurotransmisores podrían participar en el desarrollo de las diferencias sexuales del SNC, ya que la administración prenatal de drogas que afectan sistemas adrenérgicos, colinérgicos (McEwen y Parsons, 1982), serotoninérgicos,

dopaminérgicos (Döhler y cols. 1991) y gabaérgicos (Segovia y cols. 1991; Rodríguez- Zafra, y cols. 1993; Del Cerro y cols. 1995) son capaces de modificar el desarrollo de las diferencias sexuales en el cerebro y de las conductas reproductivas.

Diferencias entre los sexos han sido halladas en el contenido de neurotransmisores y de la actividad enzimática en los sistemas serotoninérgico, dopaminérgico, noradrenérgico y colinérgico (De Vries y cols. 1984), así como en el número de receptores adrenérgicos (Orensanz y cols. 1982), colinérgicos (Avissar y Sokolovsky, 1981), serotoninérgicos (Fischette y cols. 1983) y gabaérgicos (Segovia y cols. 1991; Rodríguez-Zafra y cols. 1993; Del Cerro y cols. 1995). Este dimorfismo encontrado en animales adultos no sólo indica un dimorfismo sexual funcional, sino también un posible dimorfismo estructural en los núcleos que sintetizan estos neurotransmisores y/o en los patrones de distribución de las fibras que los liberan.

Ratas tratadas perinatalmente con reserpina e inhibidores de la monoaminoxidasa (MAO) revelan una alteración en la actividad monoaminérgica que modula los efectos de la T y *per se* producen cambios en la diferenciación sexual del cerebro (Döhler, 1993). Se sabe que los antagonistas α -adrenérgicos (fenoxibenzamina) interrumpen los efectos de la T que induce el síndrome anovulatorio, previniendo la androgenización del cerebro de ratas hembras (Nishizuka, 1976; Raum y Swerdloff, 1981), y se ha sugerido que este efecto es regulado por la estimulación de los receptores β -adrenérgicos (isoproterenol) (Raum y cols. 1984).

Grossman y cols. (1987) han propuesto que durante el periodo postnatal, la T modifica sus interacciones adrenérgicas y opioides, las cuales controlan el patrón cíclico de liberación de hormona luteinizante (LH).

Otros grupos de investigadores (Jarzab y Döhler 1984; Jarzab y cols. 1986, 1987, 1990), han probado en ratas hembras, que el tratamiento postnatal con el antagonista α_1 -adrenérgico prazosina y α_2 yohimbina, o bien, con el antagonista nicotínico mecamilamina, incrementan significativamente la respuesta de liberación de LH a los esteroides gonadales durante la edad adulta (Jarzab y cols. 1987) . El tratamiento postnatal a ratas hembras con el agonista β -adrenérgico, isoproterenol, el agonista β_2 -adrenérgico, salbutamol ó el antagonista β -adrenérgico, alprenolol disminuye la respuesta a la liberación de LH a los esteroides gonadales en la edad adulta (Jarzab y cols. 1986). Ratas hembras tratadas postnatalmente con sustancias que estimulan o inhiben la síntesis de serotonina no modifica la respuesta de síntesis de LH a esteroides gonadales. Estos resultados sugieren que el sistema adrenérgico participa en la diferenciación del patrón de liberación de gonadotrofinas (Jarzab y Döhler, 1984).

La inervación serotoninérgica en el APM es mayor en la hembra que en el macho. Un patrón análogo de densidad de fibras dopaminérgicas, se ha observado en el núcleo anteroventral situado en la región periventricular del área preóptica, de manera que las hembras presentan mayor densidad de células y fibras inmunoreactivas a la tirosina-hidroxilasa, que el macho (Simerly y cols. 1985). Estas diferencias sexodimórficas durante la edad adulta dependen de la acción organizadora de los esteroides gonadales durante el período perinatal, ya que el tratamiento pre y postnatal de la hembra con TP induce un decremento significativo en el número de neuronas dopaminérgicas, no diferenciándose estas hembras tratadas del patrón cuantitativo presentado por los machos (Simerly y cols. 1985).

El NDS-APM es sexualmente dimórfico no sólo en términos de su volumen, sino también en las sustancias neuroquímicas que contienen las neuronas y en las fibras que lo inervan y que hacen contacto con otras neuronas (Commins y Yahr, 1984; Simerly y cols. 1986). Estas diferencias se establecen durante el periodo crítico pre y postnatal de la diferenciación sexual del NDS-APM (Simerly y cols. 1985).

Simerly y cols. (1986) han descrito que en la rata adulta, el NDS-APM está inervado por fibras noradrenérgicas. Estos investigadores han mostrado que la alteración de la neurotransmisión adrenérgica y serotoninérgica postnatal tienen efectos importantes sobre el desarrollo y diferenciación de este núcleo (Jarzab y cols. 1990). Tanto la estimulación como la inhibición de la síntesis de serotonina (5-HT) postnatal, participa en la morfogénesis del NDS-APM de ratas hembras. Así, se ha descrito un incremento en el volumen del NDS-APM en ratas hembras al D₁ después de la administración prenatal de *para*-clorofenil-alanina.

Estos resultados indican que este efecto estimulador sobre el desarrollo del NDS-APM puede ser inducido postnatalmente y permanecer durante la edad adulta.

Los efectos adrenérgicos sobre la diferenciación del NDS-APM son regulados principalmente por receptores α_2 - y β_2 - adrenérgicos (Jarzab y cols. 1987, 1990). La clonidina, agonista del receptor α_2 -adrenérgico, aumenta el efecto estimulador de TP sobre la diferenciación del NDS-APM de ratas hembra, y el salbutamol agonista del receptor β_2 adrenérgico produce un aumento del volumen del NDS-APM, tanto en machos como en hembras.

Se han determinado niveles más altos de opiáceos en el área del NDS-APM de hembras. El tratamiento postnatal a ratas hembras con el andrógeno no aromatizable

dihidrotestosterona inhibe la unión de los opiáceos en el NDS-APM, mientras que, el tratamiento postnatal a ratas macho, con el antiandrógeno flutamida estimula la unión de los opiáceos en el NDS-APM. No se han referido cambios con respecto a la unión de opiáceos cuando los machos o hembras son tratados postnatalmente con Tx (Döhler, 1991).

Se han encontrado evidencias de diferenciación sexual en algunos sistemas de neurotransmisión. El locus coeruleus (LC), que provee la mayor fuente de norepinefrina en el SNC; presenta mayor volumen estructural y mayor población de neuronas en la rata hembra que en el macho (Pinos y cols. 2001). El dimorfismo sexual del LC es dependiente de los esteroides gonadales durante la época postnatal (Pinos y cols. 2001). la gonadectomía postnatal del macho, induce un incremento significativo tanto en el volumen de la estructura como en el número de neuronas. No obstante, la androgenización postnatal temprana de la hembra no ocasiona masculinización, ni en el volumen ni en la población neuronal.

El sistema serotoninérgico participa importantemente en la regulación de la actividad de las hormonas sexuales durante la diferenciación sexual del cerebro. Las concentraciones de 5-HT en el cerebro de ratas en D₁₂ son más altas en las hembras que en los machos (Giulian y cols. 1973). Estos resultados han sido confirmados por Wilson y cols. (1981b) quienes encontraron que las concentraciones hipotalámicas de 5-HT y del metabolito ácido-5-hidroxiindolacético son más altos en las hembras que en los machos en D₁₀ y D₁₄.

El sistema colinérgico también contribuye significativamente en la regulación de las funciones sexuales del animal adulto, como la liberación de hormonas gonadotróficas, en la conducta sexual del macho y de la hembra (Crowley y Lemlan, 1981 Dörner y Hinz, 1978). El tratamiento de ratas ovariectomizadas con estradiol resulta en un incremento de los receptores

muscarínicos en el hipotálamo medio basal (Dörner y Hinz, 1978). Dörner y cols. 1980, administraron a ratas macho y hembras recién nacidas, piridostigmina un inhibidor de la acetilcolinesterasa, durante los primeros 14 días de vida, dando como resultado pubertad precoz en la CSM en la edad adulta (Dörner y cols. 1977a), e incrementando la expresión del patrón de conducta sexual masculina en la edad adulta (Dörner, 1980; Dörner y cols. 1977a, b).

El sistema dopaminérgico participa en la función reproductiva del animal adulto. La dopamina (DA), facilita la CSM (Malmnäs, 1973) y participa en la liberación de LH y prolactina.. También participa en la diferenciación sexual perinatal del cerebro (Hull y cols.1983). La administración de haloperidol (receptor antagonista de DA), a ratas embarazadas o lactantes, así como la apomorfina, un agonista de la DA y del α -metil-*para*-tirosina, un inhibidor de la síntesis de 5-HT, favorece la acción de la CSM en los machos cuando son adultos.

Algunas sustancias psicótropas, administradas durante el mismo período en el que los esteroides gonadales diferencian el tejido neural, mimetizan sus efectos. Esta interacción hormona-sistema de neurotransmisión ha sugerido que las concentraciones no adecuadas de las hormonas durante el período de diferenciación tienen un efecto teratogénico sobre el sistema nervioso, modificando comportamientos socialmente considerados como normales (Dörner y cols. 1983) y que están determinados por sistemas específicos de neurotransmisión.

Las concentraciones no adecuadas de esteroides durante el período fetal y/o postnatal temprano pueden estar inducidas por factores del medio externo a la madre gestante y al feto.

El estrés prenatal es uno de estos factores (Dörner y cols. 1983). Las crías macho de ratas que han sido expuestas a estrés durante la gestación presentan bajas tasas de CSM y presentan altas tasas de conducta sexual femenina en la edad adulta si se les administran estrógenos y progesterona (Ward, 1972; Kerchner y cols. 1995). El estrés prenatal disminuye los niveles plasmáticos de T en el feto macho y en el neonato, siendo esta disminución responsable de las alteraciones observadas en la conducta sexual. Estas alteraciones pueden ser prevenidas por la administración de andrógenos durante el periodo perinatal (Dörner y cols. 1983).

De este modo, es posible que los esteroides gonadales diferencian los sistemas de neurotransmisión, pero también es probable que actúen como neuromoduladores durante los periodos tempranos del desarrollo, siendo la transmisión química el proceso por el cual ejerzan sus efectos morfológicos, facilitando o inhibiendo la sinapsis.

3.9 CONDUCTA SEXUAL MASCULINA EN RATAS

3.9.1 Descripción de los Patrones Generales

La CSM en la rata es un patrón de conducta ampliamente estudiado (Larsson, 1956, 1979). La CSM puede dividirse en tres fases:

a) la precopulatoria, que incluye el olfateo, exploración genital, el aseo y la persecución del compañero. Durante esta etapa la hembra despliega sus patrones de proceptividad tales como el brincoteo, el movimiento de las orejas y el desplazamiento en zigzag (Hlinak 1983, 1986)

b) la copulatoria, que se caracteriza por una serie de montas e intromisiones, que se presentan aproximadamente cada 30 a 120 segundos y que generalmente concluyen con la eyaculación .

c) la postcopulatoria, en la que el macho después de presentar un periodo refractario lleva a cabo el autoacicalamiento genital (Meisel y Sachs, 1994).

Los patrones de la CSM de la rata se observan en la Fig. 1. Para la observación de la CSM, el macho suele ser apareado en un redondel transparente con una hembra receptiva previamente tratada con estradiol y progesterona. La hembra receptiva, ante la sujeción de sus flancos por el macho, responde con una conducta llamada lordosis que consiste en el arqueamiento del dorso, la elevación de la cabeza y zona perineal, así como el movimiento lateral de la cola, lo que facilita la inserción del pene del macho en la vagina (Fig. 1d y f).

Luego de explorar a la hembra con el olfato (Figura 1a y b), el macho se aproxima a ella por la grupa para desplegar el patrón de monta que se caracteriza por la ejecución de

movimientos pélvicos, al tiempo que sujeta con sus patas, pero sin introducir el pene en la vagina (Fig. 1c). En cambio, durante las intromisiones (Figura. 1d), o montas con inserción vaginal del pene, el macho realiza una serie de movimientos pélvicos rítmicos que concluyen con un movimiento más profundo hacia adelante, seguido de una brusca desmonta de la hembra, luego de la cual el macho siempre se lame sus genitales (Fig. 1e). Los rápidos movimientos pélvicos del macho tienen una frecuencia de 20 a 22 Hz y una duración de 0.320 a 0.383 seg (Moralí y cols. 1985). El macho no vuelve a montar inmediatamente después de una intromisión. Estos signos permiten distinguir las intromisiones de las montas.

Comúnmente, el macho consigue la penetración vaginal en el 50 a 80 % de las montas (Agmo y cols. 1995; Meisel y Sachs. 1994).

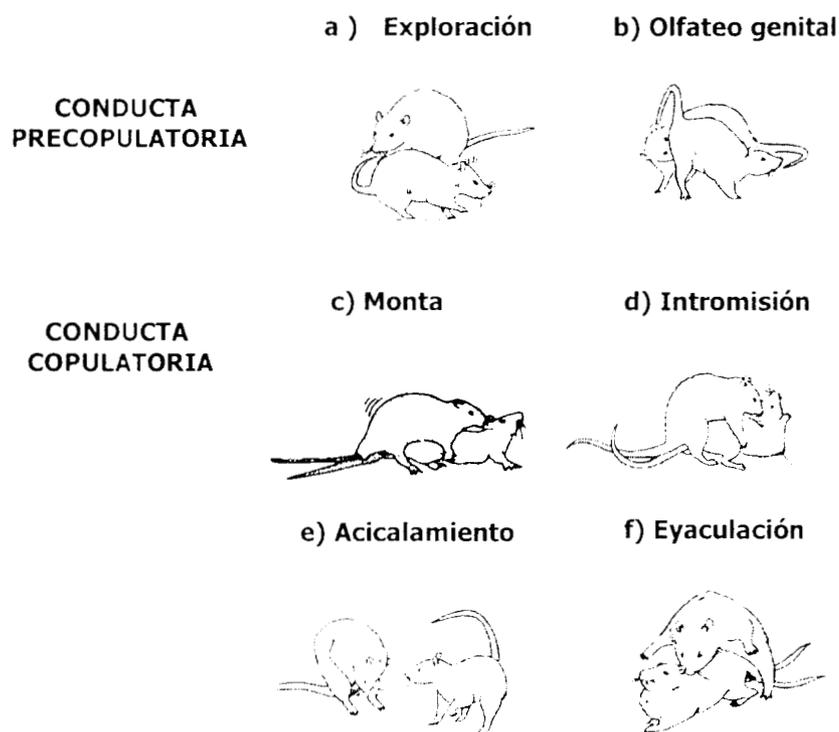


Fig. 1. Conducta sexual de la rata. (Modificado de Slob y cols. 1977)

El patrón eyaculatorio, por su parte, consiste en una monta con inserción vaginal que se caracteriza por una serie de movimientos pélvicos aún más profundos y espasmódicos que la intromisión, durante los cuales hay emisión del semen dentro de la vagina, y concluye con un movimiento pélvico hacia adelante más profundo que dura de 1 a 3 seg, seguido del movimiento lateral de sus patas delanteras y una desmonta lenta (Fig. 1f). La eyaculación ocurre normalmente después de 6 a 12 intromisiones y es seguida por un periodo de inactividad sexual llamado periodo refractario posteyaculatorio o intervalo posteyaculatorio, durante el cual el macho no responde a la estimulación sexual y que suele durar de 4 a 8 minutos, aunque normalmente se va incrementando con las series subsecuentes (Agmo 1997; Meisel y Sachs, 1994)

El intervalo posteyaculatorio ha sido dividido en dos etapas (Beach y Holtz, 1946, Beach y Nucci, 1970): el periodo refractario absoluto, en la que el macho no responde a ningún tipo de estimulación sexual y que se caracteriza por vocalizaciones ultrasónicas de 22 KHz que comprenden el 75 % de este intervalo. El periodo refractario relativo, que dura el 25% restante del intervalo en el que es posible promover el reinicio de la CSM si se le da al macho una estimulación apropiada, lo que da como resultado una reducción en este intervalo.

A la serie de eventos copulatorios que van desde que el macho inicia la primera monta hasta que ocurre la eyaculación, se le denomina serie eyaculatoria. También existe la serie copulatoria, que se diferencia de la serie eyaculatoria porque abarca, además, el periodo refractario posteyaculatorio hasta la siguiente intromisión (Fig 2).

3.9.2 Patrones Copulatorios de la Conducta Sexual Masculina.

A continuación se da la definición de los parámetros copulatorios, mismos que se observan en la Fig. 2.

Latencia de monta (LM): periodo que transcurre desde que se introduce la hembra con el macho, hasta que ocurre la primera monta (Meisel y Sachs, 1994).

Latencia de intromisión (LI): periodo que transcurre desde que se introduce la hembra con el macho, hasta que ocurre la primera intromisión (Meisel y Sachs, 1994).

Latencia de eyaculación (LE): es el tiempo que transcurre desde la primera intromisión hasta que ocurre la eyaculación en cada serie eyaculatoria.

Número de montas (NM): es el número de montas con movimientos pélvicos que realiza el macho antes de cada eyaculación.

Número de intromisiones (NI): es el número de montas con inserción peneana que realiza el macho antes de la eyaculación.

Frecuencia de eyaculaciones: es el número de eyaculaciones que ocurren durante un tiempo determinado de registro de la CSM.

Una vez que concluye el registro de la CSM, se pueden calcular lo siguiente:

Porcentaje de sujetos que eyacularon (%SsE): este porcentaje se puede calcular para toda la sesión de registro. También se puede calcular el porcentaje de machos sexualmente activos (%SsA), para distinguir a los que copulan de los que no lo hacen, o bien evaluar a los que montan (%SsM) de los que intromiten (%SsI) en cada serie eyaculatoria.

Tasa de aciertos (TA), es el número de intromisiones (NI) dividido entre el número de intromisiones (NI) más el número de montas (NM) que se presentan antes de la eyaculación.

Este parámetro alcanza el valor máximo de 1, cuando el macho sólo presenta intromisiones, lo que indica que la eficiencia copulatoria fue del 100%. Este parámetro es muy útil para evaluar tratamientos que afectan la sensibilidad peneana o la erección. También es llamado índice de eficiencia copulatoria (Meisel y Sachs, 1994).

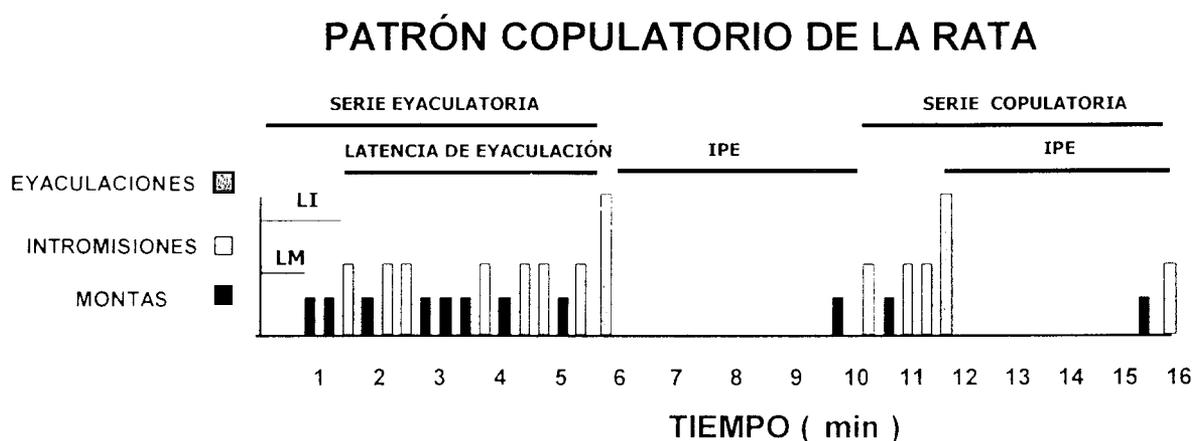


Figura 2. Gráfica que muestra la descripción temporal de los patrones que ocurren durante la cópula de la rata macho, con los parámetros que se emplean para evaluar.

Abreviaturas. LM = latencia de monta. LI = latencia de intromisión. IPE = intervalo post-eyaculatorio.

3.9.3 Componentes de la Conducta Sexual Masculina

En 1967 Beach propuso que en la regulación de la CSM existe un mecanismo nervioso dual: el primero determina la motivación necesaria para el inicio y continuidad de la conducta sexual, llamado también mecanismo apetitivo o motivacional, mientras que el segundo determina la ejecución, por lo que se le suele determinar como mecanismo ejecutorio o

consumatorio. De acuerdo con este autor, la actividad del segundo es controlada por el primero (Beach, 1967).

Posteriormente, Beyer en 1976, propuso la existencia de un tercer mecanismo: modulador, que consiste en mecanismos nerviosos inhibitorios que pueden determinar la interrupción de la CSM si las condiciones medioambientales ponen en riesgo la vida del animal o la hacen inapropiadamente (Beyer, 1976).

De acuerdo con lo anterior se ha propuesto que los parámetros que permiten evaluar el componente motivacional del macho son la LM, la LI, el III y el IPE ya que demuestran el deseo que tiene el macho por buscar el contacto sexual con la hembra (Meisel y Sachs, 1994).

Sin embargo, algunos investigadores cuestionan que la LI y el III no deberían ser tomados en cuenta para evaluar la motivación, ya que pueden ser influidos por la receptividad de la hembra, la cual, si no es adecuada, puede prolongar los valores de la LI y el III (Meisel y Sachs, 1994).

Por otra parte, los parámetros que permiten valorar la capacidad ejecutoria del macho son el NM, el NI y la LE. No obstante, un incremento en el NM puede ser el resultado de una mayor motivación, de una reducción en la sensibilidad penéana o en la erección, de una reducción en la receptividad de la hembra, o de la inexperiencia del macho o la combinación de algunos de estos factores (Meisel y Sachs, 1994). Asimismo, en la medida que un macho requiera de menos intromisiones o de un menor tiempo para eyacular LE se considera más potente o más experto.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Considerando que:

- a) Los sistemas de neurotransmisión colinérgico, serotoninérgico, noradrenérgico y dopaminérgico participan en la regulación de la conducta sexual de la rata macho (Hull y cols. 1988a, 1988b; Retana-Márquez y cols.1993; Clark y cols. 1985a; Smith y cols. 1987, Haensel y cols. 1991; Melis y cols. 1994).
- b) Durante el período crítico perinatal, cuando ocurre la diferenciación sexual cerebral, el estradiol que se deriva de la aromatización de los andrógenos, organiza el sustrato nervioso que permitirá la expresión de la conducta sexual masculina (Phoenix, 1959; Viglietti-Panzica y cols. 2001).
- c) Durante la etapa neonatal, la administración del antiestrógeno tamoxifén, produce la desmasculinización en el macho, de modo que cuando adulto presenta cambios anatómicos y estructurales en algunos núcleos del sistema vomeronasal (Vancutsem y Roessler, 1997; Vinader y cols, 2000) así como fisiológicos, reproductivos (Lephart y cols. 2001) y no reproductivos (Cáles y cols. 1992).

Es posible que:

- a) Diferentes dosis de tamoxifén administradas en la etapa neonatal, produzcan distintos grados de desmasculinización.
- b) La administración de oxotremorina (OXO), 8-hidroxi-di(2-n-propilamino)tetralina (8OH-DPAT), yohimbina (YH) y apomorfina (APO), que tienen un efecto facilitador de la conducta sexual masculina, la restituyan de manera distinta.

5. HIPÓTESIS

1) El tratamiento durante 5 días de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de tamoxifén y de Tx 12.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ durante 8 días, administrados neonatalmente tendrán un efecto similar sobre la desmasculinización de la conducta sexual masculina de ratas adultas.

2) Los tratamientos de Tx administrados neonatalmente inducirán un coeficiente de lordosis mayor que los machos control.

3) Dependiendo del grado de deterioro que haya causado el Tx administrado neonatalmente en los machos, sobre los distintos sistemas de neurotransmisión que participan en la regulación de la conducta sexual masculina, la oxotremorina, el 8OHDPAT, yohimbina y apomorfina serán capaces de estimular la CSM en animales adultos desmasculinizados.

6. OBJETIVOS

1. Evaluar el efecto de la administración neonatal de dos dosis del antiestrógeno tamoxifén, sobre el peso corporal y la conducta sexual masculina de ratas macho adultas.
2. Evaluar el efecto de la administración neonatal de dos dosis del antiestrógeno tamoxifén, sobre la conducta sexual heterotípica de ratas macho adultas.
3. Evaluar el efecto de la administración de los fármacos: oxotremorina (OXO), 8-hidroxi-2(di-n-propilamino)tetralina (8OHDPAT), yohimbina (YH) y apomorfina (APO), que facilitan la CSM, en ratas desmasculinizadas neonatalmente con dos dosis de tamoxifén.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

30 Ratas Wistar hembras del Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, fueron apareadas. Una vez preñadas, se colocaron en cajas individuales en un cuarto con temperatura, luz y humedad controlada, con libre acceso al agua y alimento (Purina Chow).

Las ratas preñadas se dividieron en cuatro grupos experimentales y diariamente se revisaron para determinar el día exacto del parto. Al día de nacimiento D_0 , las crías fueron pesadas y se determinó el sexo por la distancia anogenital.

Grupo A (Tx12.5, n=25): a todas las crías macho neonatas se les administró durante 8 días, a partir del D_0 al D_8 , inyecciones subcutáneas (s.c) de 12.5 μg de Tamoxifén disuelto en 0.05 ml de aceite de maíz (Cáles y cols. 1992, Sánchez-Santed y cols. 1993).

Grupo B (CON12.5, n=14): los sujetos recibieron un volumen igual de aceite de maíz, durante los días establecidos para el grupo A.

Grupo C (Tx100, n=33): a todas las crías macho neonatas se les administró del D_0 al día D_5 s.c 100 μg de Tamoxifén en 50 μl de aceite de maíz, (Iguchi y Ohta. 1995).

Grupo D (CON100, n=15): Los sujetos recibieron un volumen igual de aceite de maíz, durante los días establecidos para el grupo B.

Al término del tratamiento se registró el peso de las crías. Los animales fueron destetados a los 30 días de edad, a partir del día 30 de edad, los sujetos fueron revisados diariamente para registrar el día preciso del descenso testicular.

Conducta Sexual Masculina

A la edad de tres meses, se realizaron cuatro evaluaciones de la CSM cada cuatro días.

Los registros de CSM se realizaron 4 h después del inicio de la fase oscura, con iluminación roja tenue. Se colocaron a los machos (Grupos A, B, C y D) en redondeles de plexiglass transparente de 50 cm de diámetro con piso de aserrín. Se les dio 5 min de habituación a cada uno de los machos. Posterior a este tiempo la CSM fue evaluada en sesiones de 30 minutos en presencia de hembras receptoras tratadas 48 h antes del registro con 17β -estradiol (10 μ g/0.1 ml de aceite, sc) y 4 hrs antes del mismo progesterona (2mg/0.1ml).

Las pruebas se realizaron cada cuatro días hasta que los machos adquirieron la experiencia sexual necesaria para que sus parámetros fueran estables.

Los parámetros copulatorios fueron los siguientes:

- a) *Porcentaje de animales sexualmente activos que presentan montas (%SsM)*
- b) *Porcentaje de animales sexualmente activos que presentan intromisiones (%SsI)*
- c) *Porcentaje de animales sexualmente activos que eyacularon (%SsE)*
- d) *Número de montas (NM)*, antes de la eyaculación

e) *Número de intromisiones (NI)*, antes de la eyaculación.

f) *Frecuencia de eyaculación (FE)*

g) *Latencia de monta (LM)*

h) *Latencia de intromisión (LI)*

i) *Latencia de eyaculación (LE)*

j) **Tasa de aciertos (TA)**

Los parámetros se analizaron únicamente para la primera serie copulatoria considerando que casi todos los animales tratados neonatalmente con tamoxifén no eyaculaban o sólo tenían dos eyaculaciones.

Conductas sociales

Al término de las evaluaciones de CSM, se les dio una semana de descanso a los sujetos (Ss) y posteriormente se evaluó la conducta sexual femenina (CSF) de los mismos sujetos. Las pruebas de respuesta a la lordosis fueron hechas en redondeles de plexiglass transparente de 50 cm de diámetro con piso de aserrín. En donde se colocaron a machos estímulo (ME) expertos y entrenados para realizar montas vigorosas. Se les permitió tener 5 min de habituación en el redondel.

Al término de este tiempo, se aparearon los machos tratados neonatalmente con Tx (SsE) y los machos del grupo control (SsE), con cada uno de los machos ME.

La evaluación de las conductas sociales observadas en estos SsE se hicieron de acuerdo a los estudios de conducta agresiva en rata realizados por Blanchard y Blanchard, 1977.

Se observaron las siguientes conductas sociales:

a) reconocimiento: ocurrió cuando ambos machos se olfatearon.

b) huida: consistió en el alejamiento del SsE ante la acometida del ME.

c) agresión: ocurrió cuando el SsE atacó a mordidas al ME.

d) enfrentamiento: se presentó cuando el SsE se paró en sus patas traseras y se colocó frente al ME en espera, sin atacarlo.

e) rechazo: se consideró cuando el SsE encorvó el cuerpo y presentó piloerección cuando el ME se le acercó.

f) inmovilización: esta conducta se presentó cuando el SsE permaneció quieto ante la acometida del ME.

g) patrón horizontal: consistió en un ligero arqueamiento de la columna vertebral del SsE que, aunque se asemeja a la lordosis, no debe confundirse con este patrón que se presenta en la hembra, por ser menos evidente.

En este primer experimento se evaluó el porcentaje de las conductas de rechazo e inmovilización que mostraron los sujetos de los 4 grupos (A, B, C y D) ante la presencia de los ME (Fig. 3).

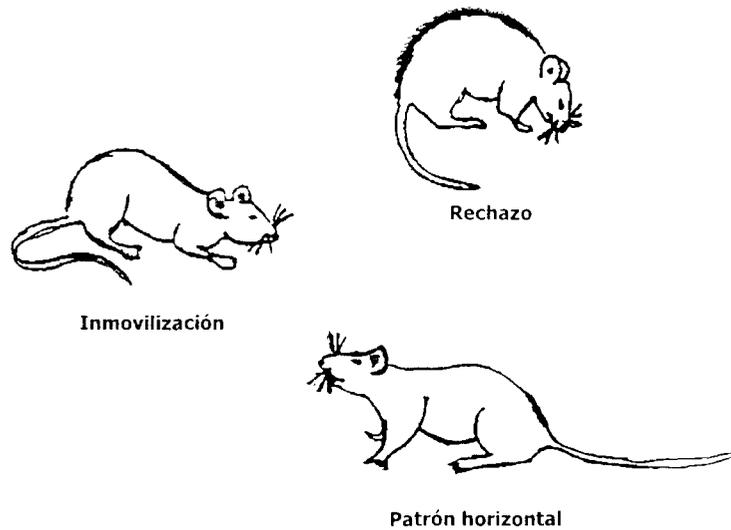


Fig. 3. Esquema que representa las conductas sociales que los sujetos experimentales desplegaron ante los macho estímulo, sin la administración de hormonas.

Conducta sexual heterotípica con la administración de hormonas

En un segundo experimento, la CSH fue evaluada con todos los machos de los grupos controles y experimentales (A,B,C y D, mismos SsE de experimentos anteriores) tratados previamente durante 10 días con 20µg/kg de estradiol disuelto en 0.5ml de aceite de maíz y 4 h antes del registro se les administró Progesterona 2mg/0.5 ml (Velázquez-Moctezuma y cols. 1984). Se colocaron dentro de los redondeles a los machos vigorosos, expertos y entrenados (ME), y se les dió 5 min de habituación. Posterior a este tiempo, se aparearon con los sujetos (SsE) de los grupos controles (A, B) y experimentales (C, D). Las respuestas fueron cuantificadas por el porcentaje de respuestas lordóticas, llamado Coeficiente de Lordosis ($LQ = \frac{\text{número de lordosis}}{10 \times 100}$) que presenten los machos experimentales ante 10 montas desplegadas por los ME.

Conducta Sexual Masculina y la administración de oxotremorina, 8-hidroxi-2 (di-n-propilaminotetralina), yohimbina y apomorfina

Dos semanas después de evaluadas las pruebas de CSM y CSH, los animales tratados neonatalmente con el antiestrógeno y sujetos controles se les aplicó cinco tratamientos: A) salina, B) oxotremorina, C) 8OHDPAT, D) yohimbina y E) apomorfina, a 10 sujetos de cada uno de los grupos control, Tx12.5 y Tx100 (Fig. 4).

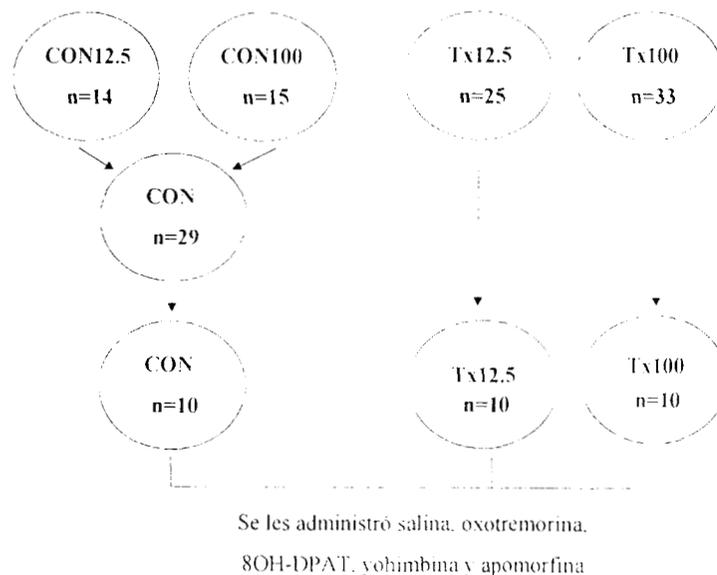


Fig. 4. Manejo de los sujetos experimentales

Para la administración de los fármacos se utilizaron dosis que tienen un efecto facilitatorio sobre la regulación de la CSM. La administración se realizó de la siguiente manera: oxotremorina, agonista postsináptico de los receptores muscarínicos (M_1) (0.4 mg/kg), administrado i.p treinta minutos antes de la prueba. Cuarenta y cinco minutos antes de la administración de OXO, se administró escopolamina metil-bromuro (3mg/kg). Para

garantizar que el efecto de la OXO fuera exclusivamente central; 8-hidroxi-2(di-n-propilaminotetralina, 8OHDPAT) agonista presináptico de los receptores 5HT_{1A} (0.125mg/kg), 15 min antes de la prueba; yohimbina (YH) receptor presináptico α_2 -adrenérgico (2mg/kg), 20 min antes de la prueba y apomorfina (APO) agonista de los receptores D₂ (80 μ g/kg), 5 min antes del inicio de la prueba. El volumen de drogas administrados a los sujetos fue de 0.1ml y la administración se realizó intraperitonealmente.

Cada semana se administró el fármaco **A)** OXO, **B)** 8OHDPAT, **C)** YH, **D)** APO y **E)** Salina (SAL), en forma de cuadro latino, cuyo objetivo es el de asegurarnos que a cada rata le toque el fármaco correspondiente en secuencia diferente (Fig. 5).

Inmediatamente después de la administración de los fármacos OXO, 8OHDPAT, YH y APO y de SAL a las ratas macho de los grupos Control y Tx12.5 y Tx100, se les registró la CSM, durante treinta minutos (Fig. 5).

A	B	C	D	E
SALINA	OXO 0.4	8OHDPAT	YH	APO
0.3 ml	mg/kg	0.125	2	80
(i.p)	ScoMbr (3mg/kg)	mg/kg	mg/kg	µg/kg

Rata	Tratamiento				
	A	B	C	D	E
1	A	B	C	D	E
2	B	C	D	E	A
3	C	D	E	A	B
4	D	E	A	B	C
5	E	A	B	C	D

n = 10



Después de la administración de estos fármacos a las ratas macho de los grupos: CON, Tx12.5 y Tx100, se les registró la conducta sexual masculina durante 30min.

Fig. 5. Diagrama en donde se representan los cinco tratamientos, la dosis del fármaco utilizado y la administración de fármacos en cuadro latino. Posteriormente a estos sujetos se les evaluó la conducta sexual masculina.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para los parámetros de CSM: LM, LI, LE, NM, NI, FE y tasa de aciertos de los grupos CON, Tx12.5 y Tx100 se utilizó una prueba no paramétrica, para grupos múltiples grupos independientes, la prueba de Kruskal-Wallis (ANOVA) con un nivel de significancia de $p < 0.01$. Se utilizó una prueba de bloques aleatorios para obtener el análisis factorial de la varianza. Cuando se detectaron diferencias significativas en la ANOVA en alguno de los parámetros de la conducta sexual se realizó la prueba de Dunn, comparando por pares, la fuente de diferencias.

Para los parámetros de CSM: LM, LI, LE, NM, NI, FE; con la administración de fármacos se utilizó una prueba no paramétrica, de medidas repetidas con un nivel de significancia de $p < 0.01$. Cuando se detectaron diferencias significativas en la ANOVA en alguno de los parámetros de la conducta sexual se realizó la prueba de Dunnett's de medidas repetidas.

Para el análisis del porcentaje de sujetos sexualmente activos (%SsM, %SsI, %SsE) en la evaluación de CSM y coeficiente de lordosis se utilizó la prueba de chi-cuadrada (χ^2) con un nivel de significancia de $p < 0.01$.

Para la comparación del porcentaje de sujetos que despliegan monta, intromiten y eyaculan en la prueba de CSM, con la administración de fármacos se aplicó la prueba de Fisher (" F "), con un nivel de significancia de $p < 0.01$.

12. RESULTADOS

Peso corporal

El tratamiento neonatal con tamoxifén a una dosis de 12.5µg/kg durante 8 días (Tx12.5) y 100µg/kg/5días (Tx100) no tuvo efectos sobre la ganancia de peso corporal de crías de ratas macho (Fig. 6).

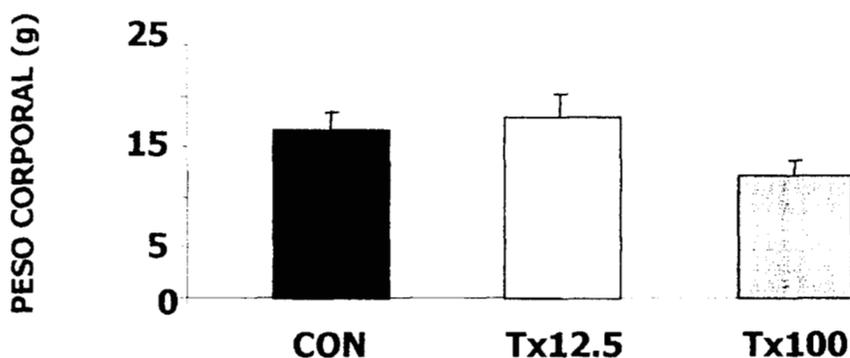


Fig. 6. La gráfica representa la ganancia de peso corporal de ratas macho recién nacidas las cuales fueron tratadas con dos dosis de tamoxifén Tx12.5: 12.5µg/kg/D₀-D₈, n =25 y Tx100: 100µg/kg/D₀-D₅ n = 33. Grupo control (CON, n=29).

Efecto de la administración neonatal de tamoxifén sobre la conducta sexual masculina

El tratamiento neonatal con la administración de ambos esquemas de Tx redujo dramáticamente la actividad sexual de ratas macho adultas. Como se ha mencionado anteriormente se realizaron cuatro evaluaciones de CSM, cada cuatro días (1, 4, 8 y 12 días).

Se analizaron los resultados del día 12 (Tabla 1), que es el registro que nos da el promedio de los parámetros a lo largo de estas pruebas, las evaluaciones se realizaron a los 3

meses de edad, es decir, los animales iniciaron siendo inexpertos sexuales y transcurrido este tiempo, adquirieron experiencia sexual, por lo tanto al día 12, y después de 4 registros, estos animales ya han adquirido experiencia y teóricamente debieron presentar actividad sexual.

Porcentaje de sujetos sexualmente activos

La administración neonatal de tamoxifén a una dosis de 12.5µg/kg y a una dosis de 100µg/kg redujo notablemente el porcentaje de Sujetos sexualmente activos (%SsA). En el caso del grupo de Tx12.5, se observó que sólo el 56% de los sujetos montan y en sólo el 63% para el grupo de Tx100 [Tx12.5, $\chi^2(1gl)=8.184$, Tx100, $\chi^2(1gl)=6.074$), $p<0.01$, prueba de Chi cuadrada] para ambos tratamientos en comparación con el grupo control (Fig. 7A). Se encontró algo semejante para el %SsI, para Tx12.5 y Tx100 sólo el 48% de los Ss intromitieron [Tx12.5, $\chi^2(1gl)=11.45$, Tx100, $\chi^2(1gl)=12.435$, $p<0.01$, prueba de Chi cuadrada] comparado con el grupo control (Fig. 7B).

Por último, el porcentaje de sujetos que eyacularon se reduce dramáticamente, para el grupo de Tx12.5 sólo el 8% eyaculan, para el grupo de animales tratados neonatalmente con Tx100 sólo el 3% eyaculan [Tx12.5, $\chi^2(1gl)=35.75$, Tx100, $\chi^2(1gl)=46.99$, $p<0.01$, prueba de Chi cuadrada] comparado con el grupo control (Fig. 8).

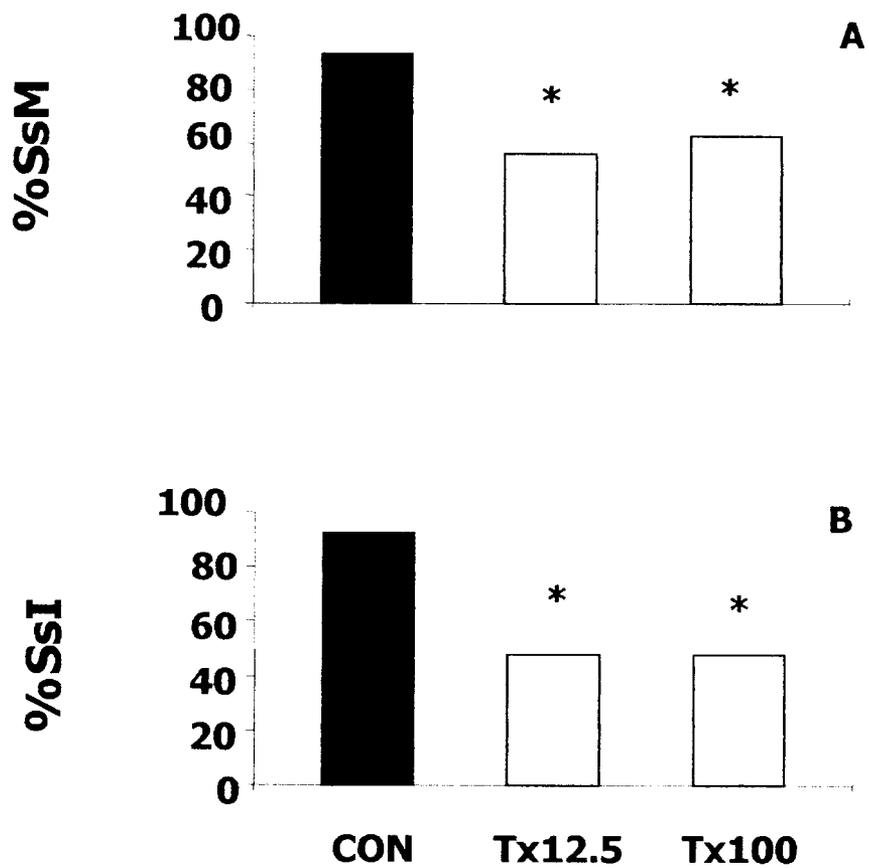


Fig. 7. Porcentaje de sujetos que montan (%SsM, A), intromiten (%SsI, B) de ratas macho adultas, las cuales fueron tratadas neonatalmente con dos dosis de tamoxifén Tx12.5: 12.5µg/kg/D₀-D₈, n =25 y Tx100: 100µg/kg/D₀-D₅ n = 33. Grupo control (CON, n=29). *p<0.01 comparado con el grupo control, prueba de χ^2 .

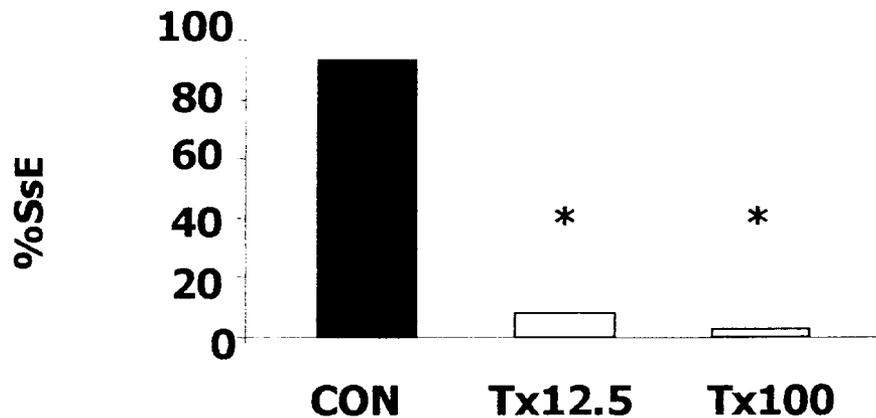


Fig. 8. Porcentaje de sujetos que eyaculan (%SsE) de ratas macho adultas las cuales fueron tratadas neonatalmente con dos dosis de tamoxifén Tx12.5: 12.5µg/kg/D₀-D₈, n =25 y Tx100: 100µg/kg/D₀-D₅, n = 33. Grupo control (CON, n=29). *p<0.01 comparado con el grupo control, prueba de χ^2 .

Latencia de monta

Al comparar los promedios de las LM obtenidos para los tres grupos se encontraron diferencias significativas [F(2,61)= 11.00525, p<0.0002] [H(2)=18.83, p<0.0001, ANOVA de Kruskal-Wallis, Tabla 1], y la prueba post hoc demostró que la LM de ambos grupos se incrementó significativamente comparado contra el grupo control (p<0.05, según prueba de Dunn, Fig. 9A).

Latencia de intromisión

Al comparar los promedios de las LI (Tabla 1) obtenidos para los tres grupos se encontraron diferencias significativas [F(2,54)= 81,52032 p<0.0001] [H(2)=28.78, p<0.0001, ANOVA de Kruskal-Wallis], y la prueba post hoc demostró que la LI de ambos grupos se incrementó significativamente comparado contra el grupo control (p<0.01, n=12 para Tx12.5; p<0.05, n= 16, para Tx100; según prueba de Dunn, Fig. 9B). Entre los grupos Tx12.5 y Tx100 también se encontró un incremento significativo (p<0.05 Tx100; según prueba de Dunn, Fig. 9B).

Latencia de eyaculación

Al comparar los promedios de las LE (Tabla 1) obtenidas para los tres grupos no se encontraron diferencias significativas [F(2,29)= 3.69544 p<0.0562] [H(2)=3.9712, p<.1373, no hubo diferencias significativas (NS), ANOVA de Kruskal-Wallis].

Se encontró que la LE para los grupos Tx12.5 y Tx100, se incrementa notablemente comparados contra el grupo control (Fig. 9C). Es decir sólo 2 machos del grupo de Tx12.5 eyacularon, mientras que en el grupo de Tx100 sólo un macho eyaculó.

Número de Montas

Al comparar los promedios del NM obtenidos para los tres grupos se encontraron diferencias significativas [F(2,61)= 14.71202 p<0.0001], Tabla 1 [H(2)=18.91, p<0.0001, ANOVA de Kruskal-Wallis], y la prueba post hoc demostró que el NM de ambos grupos se incrementó significativamente comparado contra el grupo control (p<0.05; n= 27, según prueba de Dunn, Fig. 10A).

El grupo de Tx12.5 se caracterizó por presentar mayor número de montas comparado con el Tx100 ($p < 0.05$, $n = 21$, según prueba de Dunn, Fig. 10A). Es necesario señalar que no todos los individuos de los grupos Tx12.5 y Tx100, presentaron este parámetro. Esto quiere decir que para el grupo de Tx12.5, sólo 14 de 25 presentan dicho parámetro; mientras que, para Tx100, sólo 21 de 33 montaron.

Número de intromisiones

Al comparar los promedios del NI obtenidos para los tres grupos no se encontraron diferencias significativas [$F(2,54) = 1.03084$ $p < 0.367$] Tabla 1. Se observó un patrón semejante para el grupo de Tx12.5 donde 12 individuos intromitieron y 16 para el grupo de tamoxifén a dosis de 100 μg (Fig. 10B).

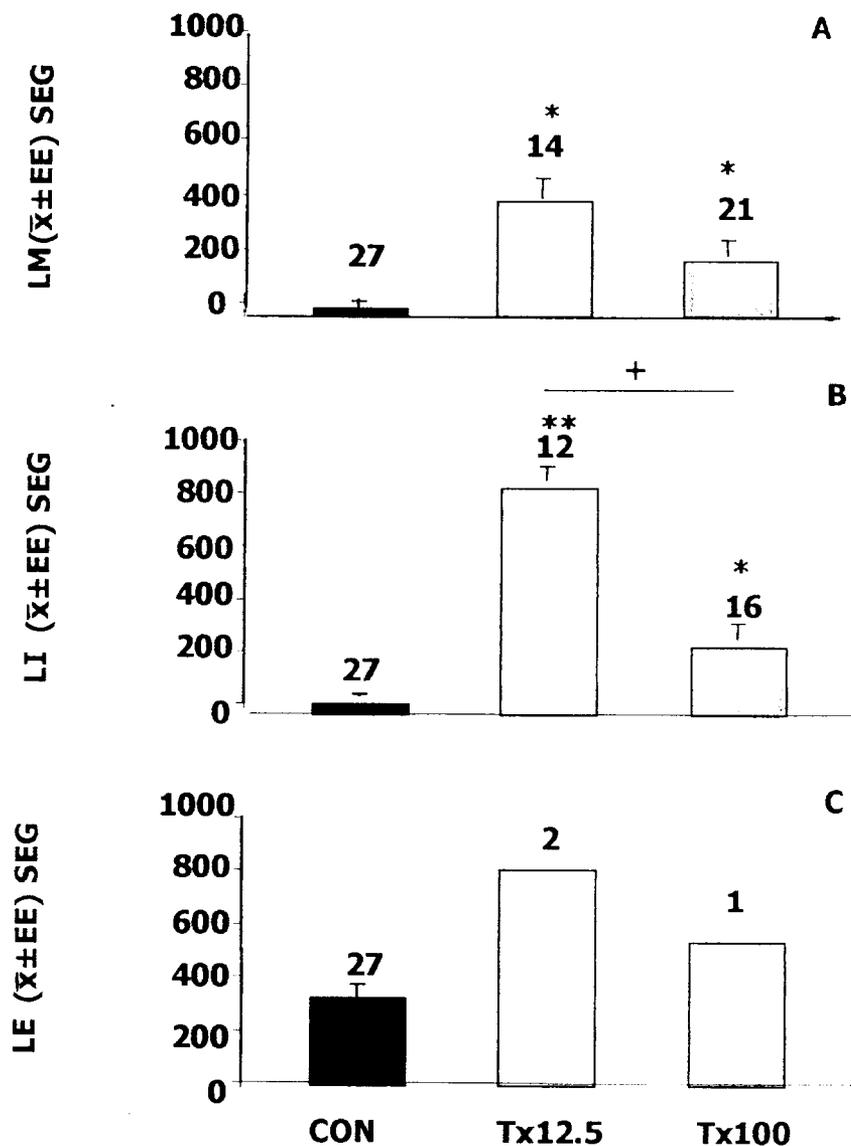


Fig. 9. A) Latencia de monta (LM), B) Latencia de intromisión (LI) y C) Latencia de eyaculación (LE) de ratas macho adultas luego de la administración diaria de tamoxifén neonatal, en dos dosis Tx12.5: 12.5µg/kg/D₀-D₈, n =25 y Tx100: 100µg/kg/D₀-D₈, n = 33. Grupo control (CON, n=29). Los valores están expresados como media ± error estándar. ANOVA de Kruskal-Wallis, seguida de prueba de Dunn. *p<0.05, **p<0.01 comparado con el grupo control, +p < 0.05 comparado con Tx. El número sobre las barras representa el número de machos que presentaron dicho parámetro.

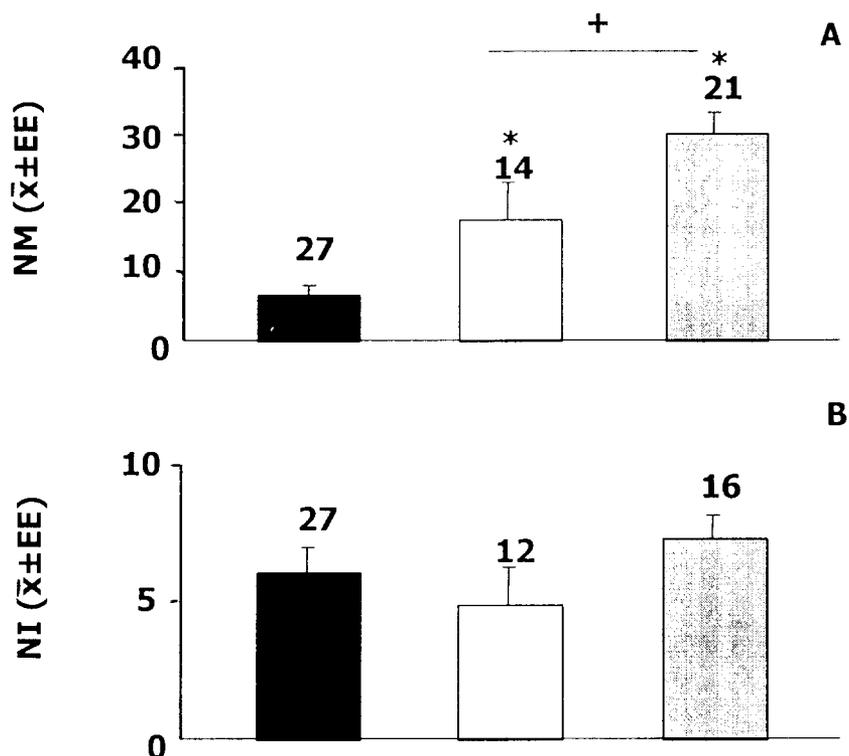


Fig. 10. A) Número de montas (NM) y B) número de intromisión (NI) de ratas macho adultas luego de la administración diaria de tamoxifén neonatal, en dos dosis Tx12.5: 12.5μg/kg/D₀-D₈, n =25 y Tx100: 100μg/kg/D₀-D₅ n = 33. Grupo control (CON, n=29). Los valores están expresados como media ± error estándar. ANOVA de Kruskal-Wallis, seguida de prueba de Dunn. *p<0.05 comparado con el grupo control, +p < 0.05 comparado con Tx. El número sobre las barras representa el número de machos que presentaron dicho parámetro.

Frecuencia de eyaculación

En cuanto a la FE para los tres grupos no se encontraron diferencias significativas entre ellos [F(2,29)= 5.97 p<0.0115] Tabla 1. En el caso de los grupos tratados con Tx12.5 y Tx100,

sólo 2 y 1 macho eyacularon, respectivamente, de tal forma que no fue posible realizar las pruebas estadísticas.

Es muy importante señalar la notable reducción del número de SsE que eyaculan, además de que los sujetos que la presentan se reduce notablemente a uno y a dos, para cada grupo Tx12.5 y Tx100, respectivamente; (Fig. 11).

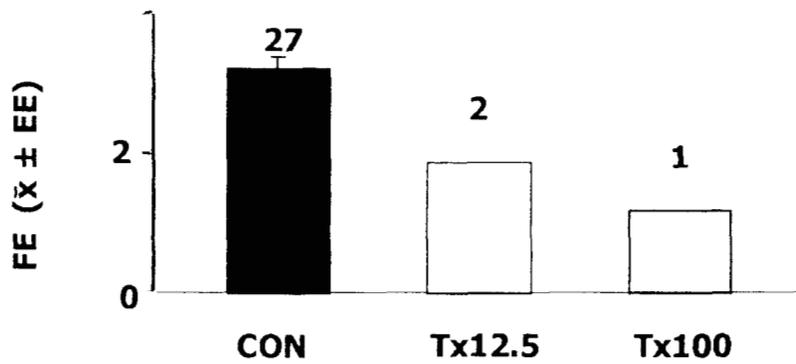


Fig. 11. Frecuencia de eyaculación (FE) de ratas macho adultas luego de la administración diaria de tamoxifén neonatal, en dos dosis Tx12.5: 12.5µg/kg/D₀-D₈, n =25 y Tx100: 100µg/kg/D₀-D₅, n = 33. Grupo control (CON, n=29). Los valores están expresados como media ± error estándar.

Tasa de aciertos

Se encuentra notablemente reducida $F(2,62)= 15.00120$ $p<0.0001$], Tabla 1 [$H(2)=14.1373$, $p<0.0001$, ANOVA de Kruskal-Wallis], en los grupos experimentales (Tx12.5, $n=14$ y Tx100, $n=21$) comparada con el grupo control. Si se comparan ambos tratamientos se observó que es menor en las ratas tratadas con Tx100 con respecto al grupo de Tx12.5, aunque no alcanza a ser significativo (Fig 12).

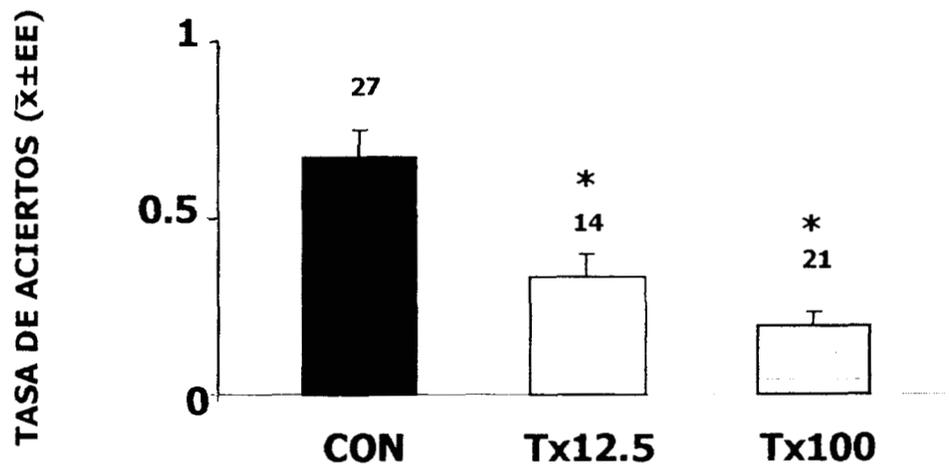


Fig. 12 Tasa de aciertos de ratas macho adultas luego de la administración diaria de tamoxifén neonatal luego de la administración diaria de tamoxifén neonatal, en dos dosis Tx12.5: $12.5\mu\text{g}/\text{kg}/\text{D}_0\text{-D}_8$, $n=25$ y Tx100: $100\mu\text{g}/\text{kg}/\text{D}_0\text{-D}_5$, $n=33$. Grupo control (CON, $n=29$). Los valores están expresados como media \pm error estándar. ANOVA de Kruskal-Wallis, seguida de prueba de Dunn. $*p<0.01$ comparado con el grupo control. El número sobre las barras representa el número de machos que presentaron dicho parámetro.

TABLA 1.

Efecto de la administración neonatal del tamoxifén sobre los parámetros de la conducta sexual de ratas macho adultas

Tratamiento (µg/kg)	Latencia de monta	Latencia de intromisión	Latencia de eyaculación	Número de monta	Número de intromisión	Frecuencia de eyaculación
Control, n=29	16.6±5.3	29.30±6.22	320.38±50.61	6.65±1.25	6±1	3.2±0.2
Tx12.5 n= 25	407.62±78.24*	810.58±36.50**	804	17.3±5.6*	4.8±1.4	2
Tx100 n=33	188.93 ± 50.4*	248.2 ± 59.12*	531	30 ± 3.33*	7.25 ± 0.91	1

Los valores están expresados como media ± error estándar. ANOVA de Kruskal-Wallis, seguida de prueba de Dunn. *p<0.05, **p<0.01 comparado con el grupo control.

CONDUCTAS SOCIALES

Esta primera prueba consistió en aparear a los sujetos experimentales (SsE) de los grupos (CON, Tx12.5 y Tx100) en presencia de machos estímulo (ME) los cuales mediante experiencias sexuales previas fueron entrenados para montar vigorosamente a cualquier sujeto, independientemente de su sexo. En esta primera evaluación se observaron en los SsE las siguientes conductas: reconocimiento, huida, agresión, enfrentamiento, rechazo, inmovilización y patrón horizontal. De las cuales sólo se evaluaron el porcentaje de rechazo y de inmovilización.

Como resultado de esta primera prueba, se observó que cuando se colocaron al macho experimental (CON, Tx12.5 ó Tx100) con un ME dentro del redondel de acrílico, durante 20 minutos: las primeras reacciones que se observaron fue la investigación por olfateo por parte del ME. este olfateo fue de aproximadamente 30 seg, seguida de piloerección y rechazo por

parte del SsE (grupo CON), es necesario mencionar que la piloerección aparece en el SsE que va atacar (enfrentamiento) y generalmente no aparece en aquellos animales que no atacan (Tx12.5 y Tx100).

Acompañado con la piloerección, también algunos SsE enseñan los dientes, esto principalmente se observó en el grupo control, animales que sólo fueron tratados neonatalmente con aceite de maíz. Además de estas situaciones, hubo una persecución precipitada del ME hacia el macho CON, mientras éste trataba de escapar (huída). Cuando el ME llegó a alcanzar al macho CON, trató de montarlo y someterlo. Como se puede ver en la Tabla 2, el macho CON manifestó una actitud de rechazo (piloerección) del 90% ($p < 0.01$, según prueba de χ^2), seguida por la conducta de agresión o de enfrentamiento entre ellos. Sólo el 10% de los machos control permanecieron quietos ($p < 0.01$, según prueba de χ^2 , Tabla 2).

Cuando se presentaron los machos de los grupos experimentales (Tx12.5 y Tx100) ante los ME, se advirtió un patrón de reconocimiento por olfateo por parte de ambos machos.

Los SsE del grupo Tx12.5, permanecieron quietos (60%, $p < 0.01$, según prueba de χ^2 Tabla 2) y 80% para el grupo Tx100 ($p < 0.01$, según prueba de χ^2 , Tabla 2). Ambos grupos de machos experimentales permitieron ser explorados e investigados por los ME, casi todos los animales tratados neonatalmente con Tx no mostraron reacciones de defensa o de ataque, más bien mostraron una actitud de sumisión. Los animales de los grupos Tx12.5 presentaron un 40% de rechazo ($p < 0.01$, según prueba de χ^2 , Tabla 2) y 80% para Tx 100 ($p < 0.01$, según prueba de χ^2 , Tabla 2). De tal modo que el ME explora y monta vigorosamente al SsE. Una vez que fue montado el SsE este responde con un ligero levantamiento de la cola y cabeza (patrón

horizontal, Fig. 3), patrón que no debe de ser confundido con el LQ y que sólo se observó en los animales tratados neonatalmente con Tx; sin la administración de hormonas.

TABLA 2.
Conductas sociales, respuesta de ratas macho adultas desmasculinizados

TRATAMIENTO	INMOVILIZACIÓN %	RECHAZO %
CONTROL	10%	90%
Tx12.5	60%*	40%*
Tx100	80%*	20%*

Grupos control (CON, n=29), Tamoxifén Tx12.5 (12.5µg/kg/8días, n=25) y Tx100 (100µg/kg/5días, n=33), comparado con el grupo control, n=10, *p<0.01. Prueba de χ^2 .

CONDUCTA SEXUAL HETEROTÍPICA

Para esta segunda prueba fue necesario administrar 17β- estradiol y progesterona a los SsE. con el objeto de que pudieran desplegar el patrón de lordosis.

Los resultados de esta segunda evaluación mostraron que los sujetos del grupo control no desplegaron lordosis (LQ=0, Tabla 3). Para las ratas tratadas neonatalmente con Tx, el LQ se incrementó significativamente en un 70% (p<0.01, según prueba de χ^2) en el grupo Tx12.5 y en un 80% en el grupo Tx100 (p<0.01, según prueba de χ^2) comparado con el grupo control (Tabla 3).

TABLA 3.

Coficiente de lordosis inducido hormonalmente en ratas macho adultas tratadas neonatalmente con tamoxifén

TRATAMIENTO	COEFICIENTE DE LORDOSIS (LQ)
CONTROL	0
Tx12.5	70*
Tx100	80*

La tabla representa el coeficiente de lordosis (LQ) de los grupos; control, Tx12.5 (12.5µg/kg/D₀-D₈) y Tx100 (100µg/kg/D₀-D₅), los cuales fueron previamente tratados con 20µg/kg de β-estradiol/10días, durante la edad adulta.

LQ= (No. de lordosis/No. de montas (10)) x 100.

Comparado con el grupo control, *p<0.01, Prueba de χ^2 , n=10, para cada uno de los grupos.

Efecto de la administración de oxotremorina, 8-hidroxi-di(2-n-propilamino)tetralina, yohimbina y apomorfina

La administración de los fármacos que facilitan la CSM, en los animales tratados neonatalmente con aceite de maíz (CON), efectivamente estimulan los parámetros de la conducta sexual masculina durante la edad adulta (Fig. 13-19, tabla 4).

Debido a que nuestros resultados muestran contundentemente que la conducta sexual masculina adulta se deteriora completamente con la administración de Tx, se sugiere que estos animales se encuentran desmasculinizados. Nosotros evaluamos el efecto de la administración de 5 tratamientos (SAL, OXO, 8OHDPAT, YH y APO) durante la edad adulta en sujetos que fueron tratados neonatalmente con dos dosis de Tx (Tx12.5 y Tx100) con el objeto de poder revertir la deficiencia de la CSM causada por Tx (Tabla 4).

Porcentaje de sujetos sexualmente activos

En el caso de los animales control el %SsM, %SsI y el %SsE se mantienen en un 100%. cuando se les administran los fármacos.

El %SsM, %SsI y %SsE, de los animales tratados neonatalmente con Tx y que durante la edad adulta recibieron salina, no presentaron modificaciones, ya que debemos recordar que se trataban de animales desmasculinizados. El tratamiento de OXO, en los grupos de Tx12.5 y Tx100. para el %SsM no se ve modificado y el %SsI para ambos grupos de Tx tienen un menor porcentaje de los sujetos que intromiten comparado con los grupos de Tx12.5 y Tx100 que recibieron salina (Fig 13A, 13B, 14). En cuanto al %SsE se observa que para ambos grupos los sujetos no eyaculan, cuando se les administra OXO, siendo estadísticamente

significativa para Tx100 ($p < 0.05$, prueba de Fisher) comparada con el grupo Tx100 a los que únicamente se les administró salina durante la edad adulta (Fig. 14).

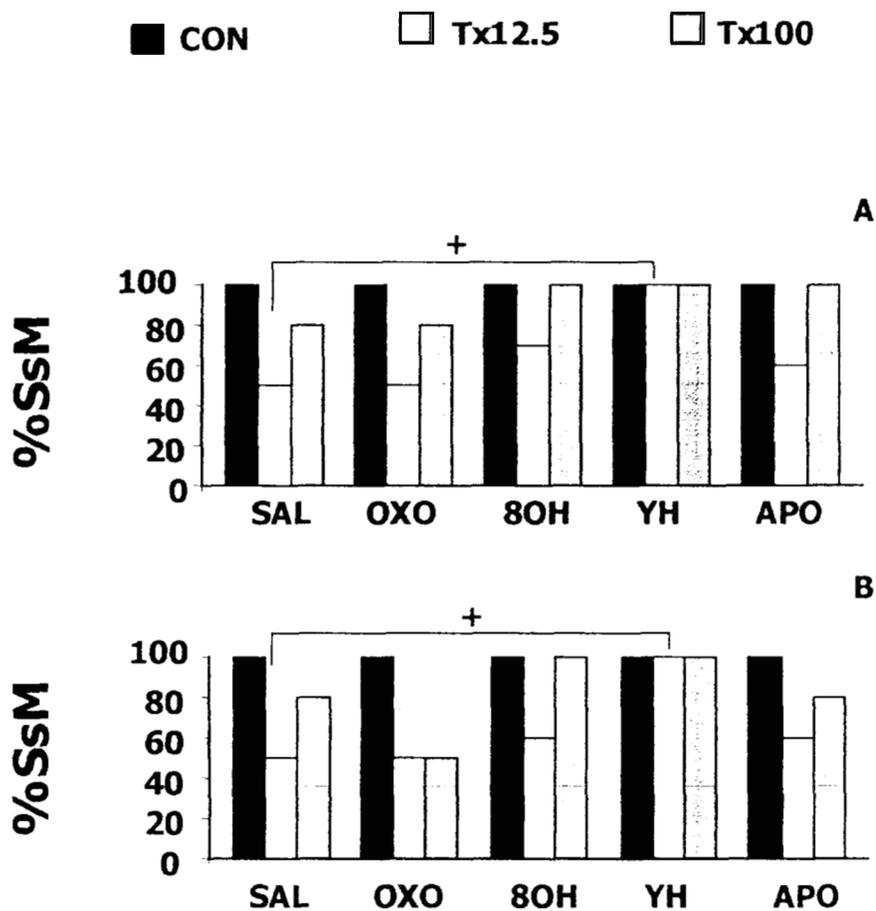


Fig. 13. Efecto de la administración de oxotremorina (OXO), 8-hidroxi-2(di-n-propilamino)tetralina (8OH), yohimbina (YH), apomorfina (APO) y solución salina (SAL) en la edad adulta, sobre el porcentaje de sujetos que A) montan (%SsM), B) intromiten (%SsI) de ratas macho tratadas neonatalmente con dos dosis de Tx 12.5 μg /durante 8 días (Tx12.5, $n=10$) y de 100 μg /5días (Tx100, $n=10$). Grupo control (CON), $n=10$. Los valores están expresados como medias \pm error estándar. Prueba de Fisher, $+p < 0.02$ en comparación con el grupo de Tx.

La administración de 8OHDPAT provoca que el %SsM, %Ssl y %SsE, para Tx12.5, no se vea modificado; para Tx100 el %SsM, %Ssl y %SsE aumentan marginalmente no llegando a ser estadísticamente significativo.

La administración de YH en el grupo de Tx12.5 produce en el %SsM y %Ssl, un incremento significativo ($p < 0.02$, prueba de Fisher) comparado con el grupo de Tx12.5 a los que únicamente se les administró salina. Para el grupo de Tx100 la administración de YH, no tuvo efectos sobre este parámetro.

Tampoco la administración de APO durante la edad adulta pudo hacer que el %SsA se incrementara, en los animales tratados neonatalmente con Tx.

De tal modo que sólo la YH es capaz de revertir el %SsM y el %Ssl en los animales del grupo Tx12.5 ($p < 0.02$, prueba de Fisher), parámetro que se encontraba inhibido en estos animales desmasculinizados. Por lo tanto ninguna de las drogas son capaces de revertir al 100% el efecto de ambas dosis de Tx en el porcentaje de sujetos que eyaculan.

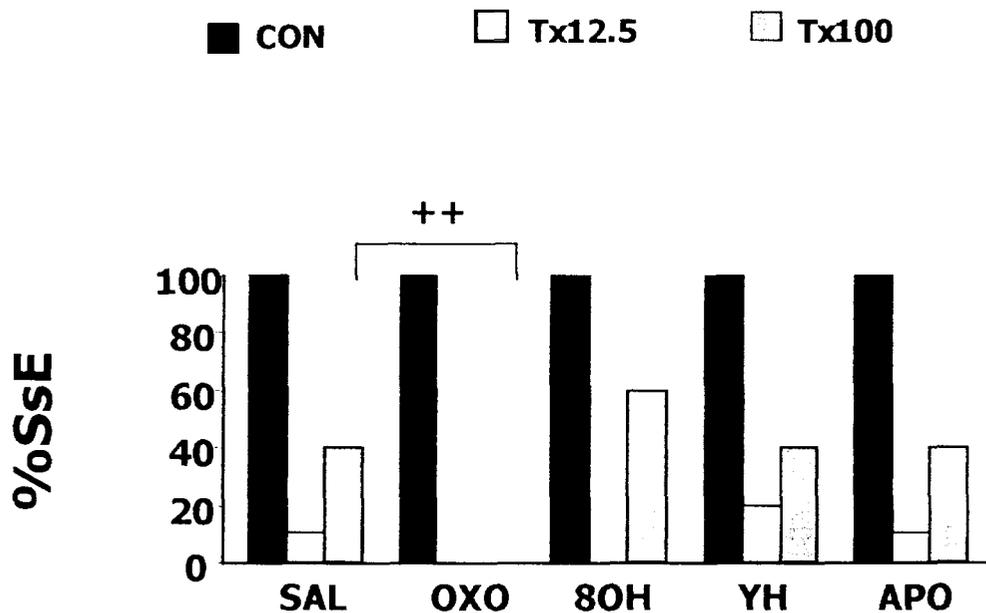


Fig. 14. Efecto de la administración de oxotremorina (OXO), 8-hidroxi-2(di-n-propilamino)tetralina (8OH), yohimbina (YH), apomorfina (APO) y solución salina (SAL) en la edad adulta, sobre el porcentaje de sujetos que eyaculan (%SsE) de ratas macho tratadas neonatalmente con dos dosis de Tx 12.5 μg /durante 8 días (Tx12.5, n=10) y de 100 μg /5días (Tx100, n=10). Grupo control (CON), n=10. Los valores están expresados como medias \pm error estándar. Prueba de Fisher +p<0.05 en comparación con el grupo de Tx.

Latencia de Monta

Al comparar las latencias de monta con cada uno de los cinco tratamientos, para cada uno de los grupos (CON, Tx12.5 y Tx100), aplicamos una ANOVA de medidas repetidas, seguida de la prueba de Dunnett, encontrando lo siguiente.

Para el grupo control tenemos que cuando se compararon las latencias de monta se encontraron diferencias significativas [$F(4,50)= 9.69684$, $p<0.0001$] Tabla 4 y la prueba post hoc demostró que la LM con los tratamientos de OXO se redujo significativamente comparado

contra el grupo control ($p < 0.01$, según prueba de Dunnett, Fig. 14). Para el tratamiento con 8OHDPAT también se redujo significativamente ($p < 0.01$, según prueba de Dunnett, Fig. 15).

Cuando se compararon las LM del grupo de Tx12.5 tenemos que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos [$F(4,33) = 1.49993$, $p < 0.2228$, NS], Tabla 4. Fig. 15).

Para el grupo de Tx100, al comparar las LM si se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos [$F(4,46) = 8.37862$, $p < 0.0001$], Tabla 4 y la prueba post hoc demostró que la LM con los tratamientos de OXO, 8OHDPAT, YH y APO se reducen significativamente comparado contra el grupo Tx100 al cual se le administro SAL ($p < 0.01$, según prueba de Dunnett, Fig. 15).

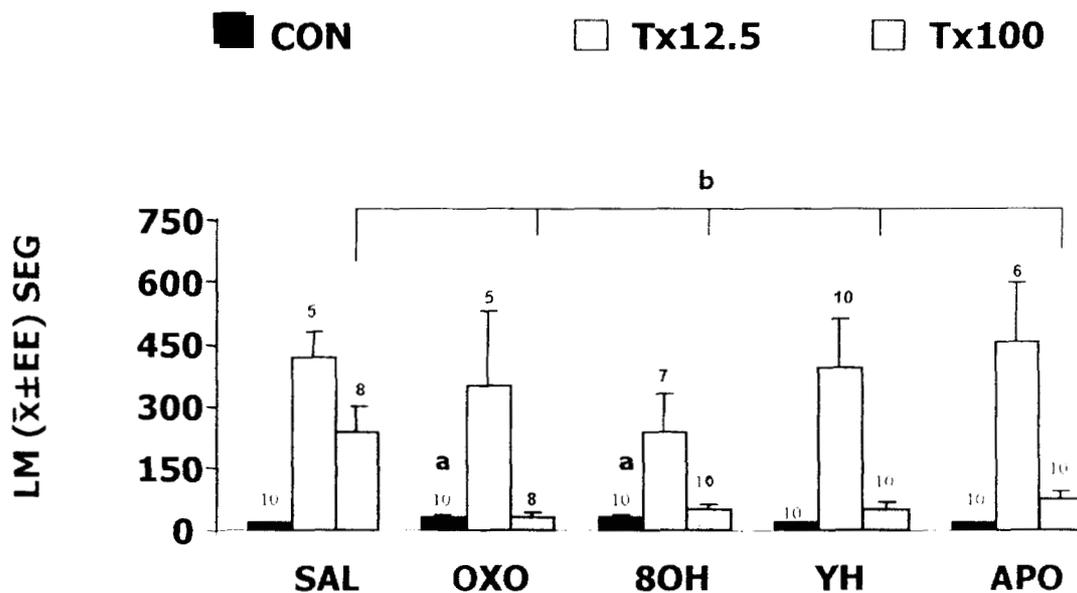


Fig. 15. Efecto de la administración de oxtremorina (OXO), 8-hidroxi-di(2-n-propilamino)tetralina (8OH), yohimbina (YH), apomorfina y solución salina (SAL) sobre la Latencia de monta (LM) de ratas macho adultas tratadas neonatalmente con tamoxifén en dosis de 12.5 μg /durante 8 días (Tx12.5, $n=10$) y de 100 μg /5días (Tx100, $n=10$). Grupo control (CON, $n=10$). Los valores están expresados como medias \pm error estándar. Prueba de Dunnett, ^a $p < 0.01$ en comparación con el grupo control salina, ^b $p < 0.01$ en comparación con Tx100 tratado con salina. El número sobre la barra representa el número de sujetos que presentaron dicho parámetro.

Latencia de intromisión

Cuando se compararon las latencias de intromisión con cada uno de los cinco tratamientos, para cada uno de los grupos (CON, Tx12.5 y Tx100), se encontró lo siguiente:

Para el grupo control tenemos que cuando se compararon las latencias de intromisión no se encontraron diferencias significativas [$F(4,50)= 2.68717$, $p<0.0422$, NS], Tabla 4. Fig. 16.

Cuando se compararon las LI del grupo de Tx12.5 tenemos que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos [$F(4,32)= 3.25214$, $p<0.026$, NS], Tabla 4) Fig. 16.

Para el grupo de Tx100, al comparar las LI sí se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos [$F(4,41)= 20.86$, $p<0.0001$], Tabla 4 y la prueba post hoc demostró que la LI con el tratamiento de OXO, se incrementa significativamente comparado con el grupo de Tx100 al cual se le administro SAL ($p<0.01$, según prueba de Dunnett) Fig. 16.

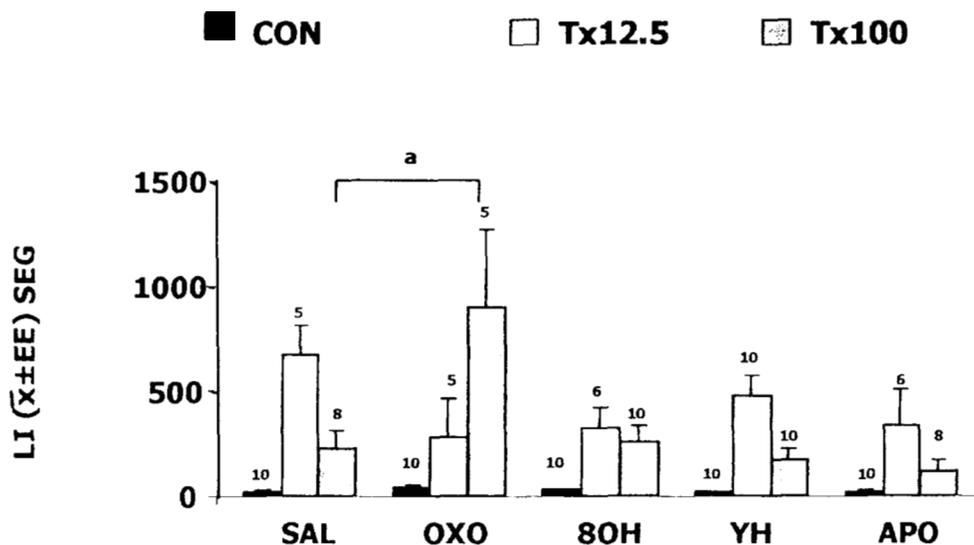


Fig. 16. Efecto de la administración de oxotremorina (OXO), 8-hidroxi-di(2-n-propilamino)tetralina (8OH), yohimbina (YH), apomorfina y solución salina (SAL) sobre la Latencia de intromisión (LI) de ratas macho adultas tratadas neonatalmente con tamoxifén en dosis de 12.5 µg/durante 8 días (Tx12.5, n=10) y de 100µg/5días (Tx100, n=10). Grupo control (CON, n=10). Los valores están expresados como medias ± error estándar. Prueba de Dunnett, ^a p<0.01 en comparación con el grupo Tx100 tratado con salina. El número sobre la barra representa el número de sujetos que presentaron dicho parámetro.

Latencia de eyaculación

Cuando se compararon las latencias de eyaculación con cada uno de los cinco tratamientos, para cada uno de los grupos (CON, Tx12.5 y Tx100), se encontró lo siguiente:

Para el grupo control tenemos que cuando se compararon las latencias de eyaculación si se encontraron diferencias significativas [$F(4,50)= 12.2926$, $p<0.0001$], Tabla 4 y la prueba post hoc demostró que la LE con el tratamiento de OXO, se disminuye significativamente ($p<0.05$, según prueba de Dunnett) comparado con el grupo CON al cual se le administró

SAL; con los tratamientos 8OHDPAT, YH y APO la LE se reduce significativamente ($p < 0.01$, según prueba de Dunnett) Fig. 17.

Cuando se compararon las LE del grupo de Tx12.5 no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos [$F(4,4) = 20.65262$, $p < 0.0078$, NS], Tabla 4. Para este parámetro en el tratamiento de SAL y APO sólo un Ss eyaculó; mientras que para el tratamiento con YH dos Ss eyacularon (Fig. 17).

Para el grupo de Tx100, al comparar las LE no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos [$F(4,18) = 4.87759$, $p < 0.0146$], Tabla 4, Fig. 17.

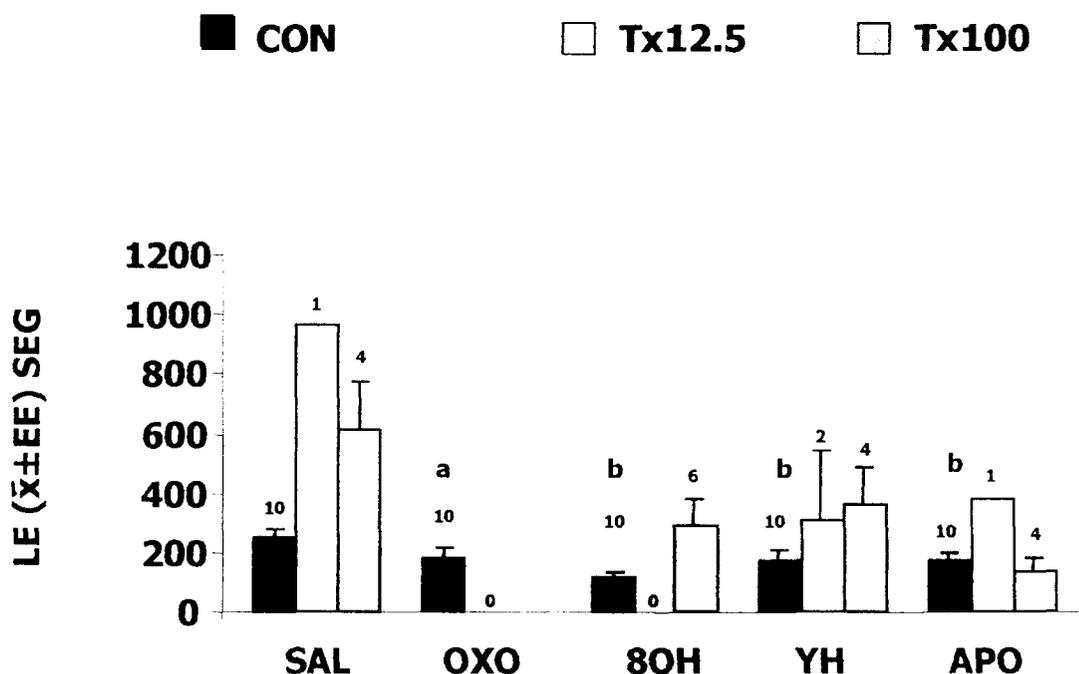


Fig. 17. Efecto de la administración de oxotremorina (OXO), 8-hidroxi-di(2-n-propilamino)tetralina (8OH), yohimbina (YH), apomorfina y solución salina (SAL) sobre la Latencia de eyaculación (LE) de ratas macho adultas tratadas neonatalmente con tamoxifén en dosis de 12.5 μg /durante 8 días (Tx12.5, $n=10$) y de 100 μg /5 días (Tx100, $n=10$). Grupo control (CON, $n=10$). Los valores están expresados como medias \pm error estándar. Prueba de Dunnett, ^a $p < 0.05$ ^b $p < 0.01$ en comparación con el grupo CON tratado con salina. El número sobre la barra representa el número de sujetos que presentaron dicho parámetro.

Número de montas

Cuando se compararon el NM con cada uno de los cinco tratamientos (SAL, OXO, 8OHDPAT, YH y APO) para cada uno de los grupos (CON, Tx12.5 y Tx100), se encontró lo siguiente:

Para el grupo control tenemos que cuando se compararon el NM si se encontraron diferencias significativas [$F(4,50)= 4.60063$, $p<0.0023$], Tabla 4 y la prueba post hoc demostró que el NM disminuyeron significativamente con los tratamientos: OXO, 8OHDPAT y APO ($p<0.05$, según prueba de Dunnett) y YH ($p<0.01$, según prueba de Dunnett) comparados con el grupo CON tratado con SAL (Fig. 18).

Cuando se compararon el NM del grupo de Tx12.5 tenemos que si se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos [$F(4,33)= 77.73816$, $p<0.0001$], Tabla 4. El tratamiento de YH redujo el NM ($p<0.01$, según prueba de Dunnett), y 8OHDPAT incrementó significativamente este parámetro ($p<0.01$, según prueba de Dunnett) comparados con el grupo de Tx12.5 al que se les administró durante la edad adulta agua destilada y salina (vehículos donde se disolvieron los fármacos, respectivamente), Fig. 18.

En el caso del grupo de Tx100, al comparar el NM si se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos [$F(4,41)= 50.72725$, $p<0.0001$], Tabla 4. Los tratamientos: OXO, 8OHDPAT, YH y APO redujeron significativamente el NM ($p<0.01$, según prueba de Dunnett) comparados con el grupo de Tx100 al que se les administró durante la edad adulta salina. Fig. 18.

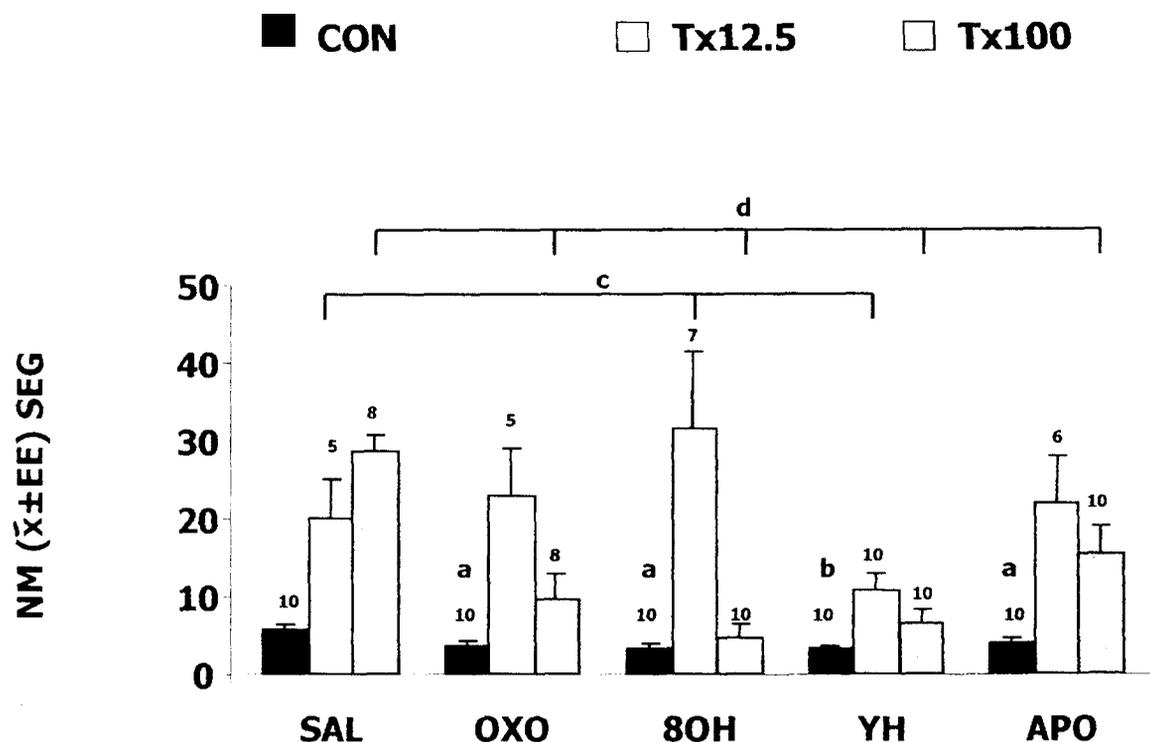


Fig. 18. Efecto de la administración de oxotremorina (OXO), 8-hidroxi-di(2-n-propilamino)tetralina (8OH), yohimbina (YH), apomorfina y solución salina (SAL) sobre el número de montas (NM) de ratas macho adultas tratadas neonatalmente con tamoxifén en dosis de 12.5 µg/durante 8 días (Tx12.5, n=10) y de 100µg/5días (Tx100, n=10). Grupo control (CON, n=10). Los valores están expresados como medias ± error estándar.

Prueba de Dunnett, ^a p<0. 05, ^b p<0. 01 en comparación con el grupo CON tratado con salina; ^c p<0. 01 en comparación con el grupo Tx12.5 tratado con salina; ^d p<0. 01 en comparación con el grupo Tx100 tratado con salina. El número sobre la barra representa el número de sujetos que presentaron dicho parámetro.

Número de intromisiones

Cuando se compararon el NI con cada uno de los cinco tratamientos (SAL, OXO, 8OHDPAT, YH y APO) para cada uno de los grupos (CON, Tx12.5 y Tx100), se encontró lo siguiente:

Para el grupo control tenemos que cuando se comparó el NI si se encontraron diferencias significativas [$F(4,50)= 11.08984$, $p<0.0001$], Tabla 4 y la prueba post hoc demostró que el NI disminuyeron significativamente con los tratamientos: OXO, 8OHDPAT, YH y APO ($p<0.01$, según prueba de Dunnett) comparados con el grupo CON al cual se le administro SAL (Fig. 19).

Cuando se compararon el NI del grupo de Tx12.5 tenemos que si se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos [$F(4,32)= 117.70218$, $p<0.0001$], Tabla 4. El tratamiento de OXO, YH y APO redujeron significativamente el NI ($p<0.01$, según prueba de Dunnett) comparados con el grupo de Tx12.5 tratados con salina, Fig. 19.

En el caso del grupo de Tx100, al comparar el NI si se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos [$F(4,41)= 18.56872$, $p<0.0001$], Tabla 4. La administración de APO incrementó significativamente el NI ($p<0.05$, según prueba de Dunnett) comparados con el grupo de Tx100 al que se les administró durante la edad adulta salina (vehículo donde se disolvió el fármaco), Fig. 19.

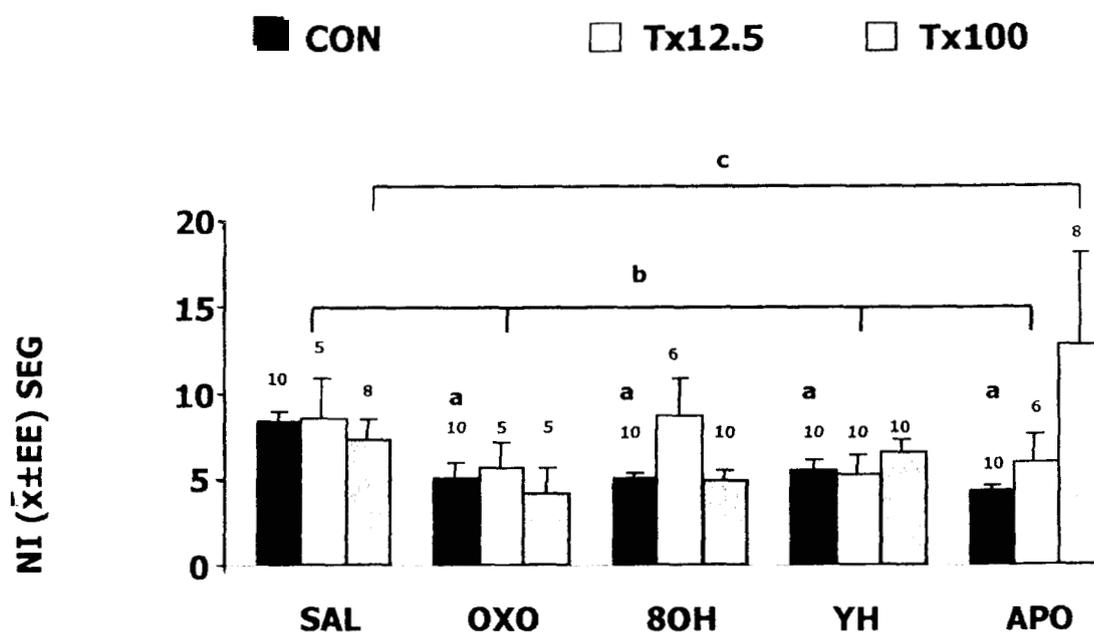


Fig. 19. Efecto de la administración de oxotremorina (OXO), 8-hidroxi-di(2-n-propilamino)tetralina (8OH), yohimbina (YH), apomorfina y solución salina (SAL) sobre el número de montas (NM) de ratas macho adultas tratadas neonatalmente con tamoxifén en dosis de 12.5 μg /durante 8 días (Tx12.5, n=10) y de 100 μg /5días (Tx100, n=10). Grupo control (CON, n=10). Los valores están expresados como medias \pm error estándar. Prueba de Dunnett, ^a p<0.01 en comparación con el grupo CON tratado con salina; ^b p<0.01 en comparación con el grupo Tx12.5 tratado con salina; ^c p<0.01 en comparación con el grupo Tx100 tratado con salina. El número sobre la barra representa el número de sujetos que presentaron dicho parámetro.

Frecuencia de Eyaculación

Cuando se comparó la FE de cada uno de los cinco tratamientos (SAL, OXO, 8OHDPAT, YH y APO) para cada uno de los grupos (CON, Tx12.5 y Tx100), se encontraron los siguientes resultados:

Para el grupo control tenemos que cuando se comparó la FE si se encontraron diferencias significativas [F(4,50)= 7.63814, $p<0.0001$], Tabla 4) y la prueba post hoc demostró que la FE se incrementó significativamente con los tratamientos: 8OHDPAT y APO ($p<0.01$, según prueba de Dunnett) comparados con el grupo CON al cual se le administro SAL (Fig. 20).

Cuando se compararon la FE del grupo de Tx12.5 tenemos que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos [F(4,4)= 14.4, $p<0.003$], Tabla 4, Fig. 20.

En el caso del grupo de Tx100, al comparar la FE no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos [F(4,18)= 5.57271, $p<0.0013$], Tabla 4, Fig. 20.

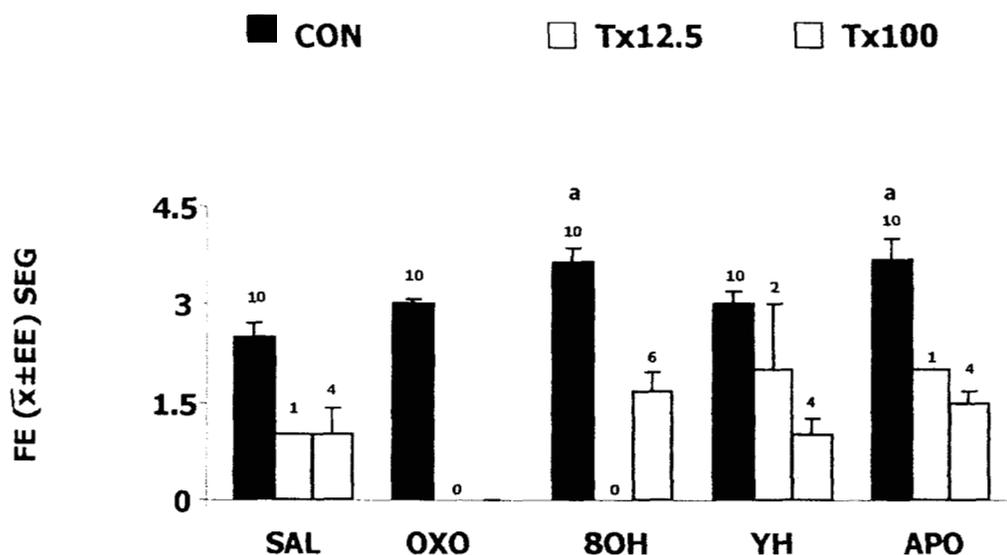


Fig. 20. Efecto de la administración de oxotremorina (OXO), 8-hidroxi-di(2-n-propilamino)tetralina (8OH), yohimbina (YH), apomorfina y solución salina (SAL) sobre frecuencia de eyaculación (FE) de ratas macho adultas tratadas neonatalmente con tamoxifén en dosis de 12.5 μg /durante 8 días (Tx12.5, $n=10$) y de 100 μg /5días (Tx100, $n=10$). Grupo control (CON, $n=10$). Los valores están expresados como medias \pm error estándar. Prueba de Dunnett, ^a $p<0.01$ en comparación con el grupo CON tratado con salina. El número sobre la barra representa el número de sujetos que presentaron dicho parámetro.

Tabla 4.

Efecto de fármacos monoaminérgicos y colinérgicos sobre la regulación de la conducta sexual masculina de ratas tratadas neonatalmente con tamoxifén

Latencia de monta					
Tratamiento	Salina	OXO	8-OH-DPAT	YH	APO
CON	16 ± 5.38	32.4 ± 6.5**	31.3 ± 4.6**	18.7 ± 3.5	18.4 ± 2
Tx8	420.5 ± 61.7	350.8 ± 178.6	240.6 ± 89	391.7 ± 119.15	457 ± 141
Tx5	238 ± 63.1	34 ± 7.1**	53.1 ± 12**	51.8 ± 14.7**	72 ± 18.7**
Latencia de intromisión					
Tratamiento	Salina	OXO	8-OH-DPAT	YH	APO
CON	24.18 ± 6.14	39.37 ± 10.45	34.4 ± 3.7	21.7 ± 4.5	25 ± 4.50
Tx8	674.5 ± 143.66	282.66 ± 190.81	327.5 ± 100	473 ± 113	342.25 ± 173.19
Tx5	232.86 ± 78.34	902 ± 364.42*	263.76 ± 76.89	172 ± 57.58	119.6 ± 53.08
Latencia de eyacuación					
Tratamiento	Salina	OXO	8-OH-DPAT	YH	APO
CON	255.90 ± 25	178 ± 35.86*	117.74 ± 26.29**	175.4 ± 33.53**	172.44 ± 22.18**
Tx8	964	NE	NE	302.5 ± 239.5	375
Tx5	615 ± 165.28	NE	288.16 ± 92.76	358.5 ± 127.49	139 ± 37.9
Número de montas					
Tratamiento	Salina	OXO	8-OH-DPAT	YH	APO
CON	5.78 ± 0.78	3.55 ± 0.58*	3.36 ± 0.60*	3.27 ± 0.41**	3.93 ± 0.75*
Tx8	19.9 ± 5	22.8 ± 6.1	31.5 ± 10.15**	10.7 ± 2.29**	16.2 ± 6.3
Tx5	28.47 ± 2.47	9.6 ± 3.26**	4.33 ± 0.9**	6.42 ± 1.86**	15.42 ± 3.56**
Número de intromisiones					
Tratamiento	Salina	OXO	8-OH-DPAT	YH	APO
CON	8.3 ± 0.64	5 ± 1**	5 ± 0.39**	5.5 ± 0.53**	4.23 ± 0.37**
Tx8	8.33 ± 2.4	5.6 ± 1.5**	8.6 ± 2.22	5.22 ± 1.19**	6 ± 1.59**
Tx5	7.2 ± 1.3	4.2 ± 1.39	4.8 ± 0.64	6.54 ± 0.77	12.8 ± 5.37*
Frecuencia de eyacuación					
Tratamiento	Salina	OXO	8-OH-DPAT	YH	APO
CON	2.5 ± 0.23	3 ± 0.1	3.6 ± 0.24**	3 ± 0.19	3.77 ± 0.32**
Tx8	1	NE	NE	2 + 1	2
Tx5	1 ± 0.35	NE	1.6 ± 0.47	1 ± 0.37	1.5 ± 0.61

10. DISCUSIÓN

El periodo perinatal es determinante para que se lleven a cabo los efectos organizacionales de las hormonas, que participan en el proceso de diferenciación sexual; durante este, los esteroides gonadales actúan no solamente en la diferenciación de señales funcionales y morfológicas del cerebro, sino también interaccionan con los sistemas de neurotransmisión, los cuales a su vez son parte importante de muchos eventos fisiológicos.

Durante este periodo crítico del desarrollo, el cerebro se encuentra expuesto a los estrógenos, y éste puede sufrir modificaciones morfológicas o fisiológicas; marcadores de la diferenciación sexual (Levy y cols. 1995).

De tal forma que, para que la CSM de la rata macho se exprese en la edad adulta es necesario que durante la etapa perinatal las estructuras cerebrales que participan en su regulación se hayan organizado, esto quiere decir que los esteroides tienen dos formas de actuar: “organizando” durante el período temprano del desarrollo las vías nerviosas responsables de las conductas reproductoras, estos efectos van a ser permanentes e irreversibles; y “activando” estas vías nerviosas ya organizadas cuando el organismo es adulto para que las conductas que dichas vías controlan puedan ser inducidas (Phoenix y cols. 1959).

En nuestro estudio nosotros administramos un potente antiestrógeno que inhibe la unión de estradiol a los receptores de estrógeno, el Tamoxifén. Aunque se conocen otros compuestos con actividad antiestrogénica, el Tx es uno de los pocos comercialmente disponible que atraviesan la barrera hematoencefálica (Kritzer y Pugach, 2001), llevando a cabo sus efectos sobre los mecanismos celulares que participan en las respuestas biológicas (Lonard y Smith, 2002).

La administración de Tx produce una deficiencia de la CSM, al bloquear la estimulación de la T (Bonsall y cols. 1991). Nuestros resultados son contundentes al mostrar que estas ratas macho adultas tratadas neonatalmente con Tx, están desmasculinizadas y feminizadas. Se sabe que este antiestrógeno impide que el estradiol se una a sus receptores, de tal forma que este proceso impide que se lleve a cabo la aromatización, el cual es fundamental para que se masculinizen las estructuras del SNC que regulan las conductas sexualmente dimórficas (Harlan y cols. 1979). Estos resultados apoyan el concepto de que el estradiol es fundamental para que se exprese la conducta sexual masculina. Así lo corroboran estudios en los cuales han evaluado el efecto de esteroides en la amígdala media y APM, encontrando que se incrementa la actividad sexual de roedores (Wood y Williams, 2001).

Los resultados de este estudio apoyan previos trabajos en los que se muestra que la administración neonatal de Tx a ratas macho, modifica permanentemente el despliegue de la CSM durante la edad adulta (Döhler, 1991; Csaba, 1986, 2001). Aunque las dosis utilizadas de Tx se administraron en dos esquemas diferentes (12.5µg 8días y 100µg/5días), ya que se ha mostrado que estas dosis son capaces de inhibir la conducta masculina de la rata (Cáles y cols. 1992; Gill-Sharma y cols. 2001, Vancutsem y Roessler, 1997), no se encontraron diferencias entre ellos.

En nuestros resultados obtuvimos que el %SsM, %SsI y el %SsE de ratas macho adultas tratadas neonatalmente con Tx12.5 y Tx100, se reduce significativamente en ambos grupos ($p < 0.01$, según prueba de χ^2) cuando se comparan con el grupo control. Y el efecto que se observa entre ambos grupos de Tx es muy similar.

Los otros parámetros copulatorios evaluados para los grupos de Tx12.5 y Tx100, evidenciaron que la LM se incrementa significativamente ($p < 0.05$, según prueba de Dunn) cuando se comparan con el grupo control: y no se observan diferencias entre los grupos tratados con Tx. Para el caso de la LI, tenemos que con Tx12.5 se incrementa ($p < 0.01$, según prueba de Dunn) y para Tx100 ($p < 0.05$, según prueba de Dunn) en comparación del grupo control. En este caso parece ser que la dosis más efectiva, para lograr que el macho tarde más tiempo en montar, es con Tx12.5. En el caso de la LE, también las ratas tratadas neonatalmente con Tx12.5, tienen una latencia mayor comparada con el Tx100 y para los dos grupos la LE es mucho mayor cuando se comparan con el grupo control (Fig. 9C).

Estos datos evidencian que nuestros machos tratados con Tx (12.5 y 100 μ g/kg) están desmasculinizados y tardan muchísimo tiempo en montar (Fig. 9A), intromitir (9B) y en eyacular (sí es que eyaculan, 9C).

En lo que se refiere al NM, este parámetro también se incrementa significativamente ($p < 0.01$ según prueba de Dunn) en ambos grupos de Tx cuando se compara con el grupo control: en este caso se observan diferencias entre los grupos tratados con Tx, ya que aquí la dosis que hace que el NM sea mayor es la de Tx100 ($p < 0.05$ según prueba de Dunn) cuando la comparamos con el grupo de Tx100. En el NI no se encontraron diferencias para los animales tratados con Tx cuando se compararon con el grupo CON. Estos animales se encuentran desmasculinizados y se manifiesta no sólo en los parámetros anteriormente analizados sino en la FE la cual se encuentra notablemente reducida, incluso la mayoría de los SsE no eyaculan.

La dosis de Tx12.5 fue administrada del D₁ al D₈ y la de Tx100 D₁ al D₅. Para explicar por que posiblemente una dosis sea más efectiva que otra debemos de tomar en

cuenta la dosis y el tiempo (o período en la que se administró el Tx), es decir el período crítico de diferenciación en la que se administra el antiestrógeno, etapa en la cual el cerebro puede ser más vulnerable a ser modificado por la acción del Tx (Rhees y cols. 1990; Davis y cols. 1995).

Sin embargo en este estudio no hubo diferencias de efecto entre los grupos.

Asimismo se sugiere que el NDS-APM puede ser utilizado como modelo para estudiar los mecanismos de la acción hormonal durante la diferenciación sexual (Döhler y cols. 1984b; Hsu y cols. 1998). presenta un periodo prenatal sensible a hormonas que comienza el día 18 de gestación (E₁₈) y finaliza postnatalmente en el D₅ (Rhees y cols. 1990); posteriormente Davis y cols. han sugerido que este período puede extenderse hasta el D₂₉ postnatal (Davis y cols. 1995). Por lo tanto el periodo en el cual se administra el antiestrógeno Tx, es determinante para que durante la edad adulta, esta conducta sea expresada deficientemente, incrementándose las LM, LI, LE, NM y NI y disminuyéndose la FE.

Además esta manipulación hormonal durante la etapa neonatal, es crítica para que las estructuras y vías nerviosas se organicen y el efecto es permanente e irreversible (Davis y cols. 1995).

Nuestros resultados sugieren que el Tx tiene propiedades antiestrogénicas, efectos que se observan en inhibición de la conducta sexual masculina de estas ratas.

Otros estudios muestran que la administración de Tx induce cambios morfológicos en estructuras del cerebro, que regulan la CSM: así se señalan de manera importante, el área preóptica media, NDS-APM (Döhler, 1991), amígdala media, área preóptica anterior (Wood y Williams, 2000), área hipotalámica anterior (Hsu y cols. 1998). Además se ha observado una reducción en el volumen y en el número de neuronas del NDS-APM en ratas macho, a las

cuales se les administra Tx del D₀₋₅ (Iguchi y Ohta, 1995). Estos resultados apoyan los estudios pioneros de Phoenix referentes al efecto organizacional (o permanentes) de las hormonas esteroides durante períodos tempranos del desarrollo, los cuales posteriormente son activados (o transitorios) durante la edad adulta (Phoenix, 1959).

Otras investigaciones han mostrado una pérdida neuronal en el NDS-APM y en el APM de ratas macho recién nacidas, modificadas por la administración de 100 tg de Tx (Vancutsem y Roessler, 1997). En la rata, la reducción de este núcleo se ha asociado con una inhibición de la conducta sexual masculina (Döhler, y cols. 1991); y se sabe que durante el desarrollo, los estrógenos son necesarios para masculinizar el NDS-POA, amígdala media, área preóptica anterior (Wood y Williams, 2001). También se ha propuesto que la disminución del volumen del NDS-APM, podría ser interpretado como un efecto desmasculinizante del Tx, el cual tiene alteraciones sobre la conducta sexual del adulto (Vancutsem y Roessler, 1997).

De tal forma, que este efecto neonatal puede ser responsable de la pérdida dramática de actividad sexual en este estudio, observándose en un incremento de las LM, LI, LE (Fig. 9A, 9B y 9C), NM, NI (Fig. 10A, 10B), y una disminución de la FE (Fig. 11), además de que el porcentaje de sujetos que %SsM, %SsI y %SsE de ratas macho se encuentra dramáticamente reducido (Fig. 7A-7B y 8).

La importancia que tiene el NDS-APM en el control de la CSM se deriva de varias líneas de investigación, las cuales incluyen estudios de lesión (Gorski y cols. 1978, Arendash y Gorski, 1983, De Jonge y cols. 1989), estimulación eléctrica, implante de hormonas, neurotransmisores o bien tejido fetal o el uso de otras técnicas (McCarthy y cols. 1993), estrés prenatal (Rhees y cols. 1999), analizando el efecto de estas manipulaciones sobre el NDS-APM, de ratas macho y su relación entre el desarrollo morfológico de éste núcleo y la

conducta copulatoria de estos sujetos. De este modo es posible que aunque el NDS-APM no es el único sitio del cerebro donde puedan actuar los fármacos administrados en este trabajo, la integridad funcional es una condición necesaria para la expresión de la conducta sexual masculina que puede estar determinada por la estimulación hormonal o farmacológica.

Así ratas macho expuestas a un agente antiestrogénico (Tx12.5 y 100µg/kg) durante la etapa neonatal, mostraron una deficiencia de la CSM (Tabla 1 y 4). Estos resultados indican que la influencia de los estrógenos prenatales es importante para la expresión de la CSM cuando el animal es adulto (Vega Matuszczyk y Larsson, 1995). Varios estudios sugieren que la aromatización de testosterona a estradiol es clave en estos procesos de diferenciación cerebral y conductual. Así machos tratados neonatalmente con Tx12.5 y Tx100 mostraron disminución y deterioro de la CSM cuando son adultos (Fig. 7-11, Tabla 1). Mientras que los machos tratados con el vehículo (aceite de cártamo) presentaron una eficiente conducta copulatoria (Fig. 7-11, Tabla 1). Pese a eso, los SsE (Tx12.5 y Tx100) montan e intromiten, a la hembra receptiva, pero no eyaculan (Fig. 11), por lo consiguiente ratas macho tratadas neonatalmente con Tx, mostraron un deterioro de la CSM, el cual se manifiesta por un incremento en el NM, NI, LM, LI y LE (Fig. 7-11) pero sin llegar a eyacular (Fig. 5C), por lo tanto estas ratas se encuentran desmasculinizadas.

También estos SsE tratados con Tx han sido feminizados, nuestros resultados así lo corroboran. Estos SsE fueron sometidos a dos evaluaciones, las cuales consistieron en colocarlos ante machos estímulo (entrenados previamente para montar vigorosamente): la primera prueba nos da evidencia de que los SsE tratados neonatalmente con Tx presentan una actitud de sumisión, no presentan indicios de defensa o ataque hacia el ME. El ME por su parte inicia un reconocimiento genital por olfateo dirigido al SsE. Los machos del grupo

Tx12.5 y Tx100 permiten que el macho se les acerque, quedando quietos (Tabla 2) y más aún permiten ser montados por el ME (Tabla 3); situación que a diferencia de los controles, respondieron con rechazo (Tabla 2, Fig. 3), encorvando su cuerpo, con piloerección y respondiendo de forma agresiva, enfrentándoseles y de ninguna manera permitieron ser montados (Tabla 3).

Se ha mostrado que la serotonina participa en el control de la agresión en muchas especies de animales (Kravitz, 2000) y que pueden ser moduladas por efectos organizacionales y activacionales de los esteroides (Phoenix y cols 1959). Lo más probable es que estos animales tratados con Tx tengan una inhibición de T y esta no sólo de como respuesta una deficiencia de la CSM, sino también en otras conductas en la cual tiene una participación importante esta hormona (Goy y McEwen, 1980).

En una segunda prueba a los SsE se les administró estradiol y progesterona, se pusieron en presencia de los ME para que estos montaran a los SsE, nuestros resultados indicaron que la conducta femenina esta ausente en los machos control y no desplegaron lordosis (Tabla 3); por el contrario los machos tratados neonatalmente con Tx (12.5 y 100) desplegaron la respuesta femenina de lordosis cuando el macho estímulo los monta (Tabla 3), por consiguiente estos machos se encuentran feminizados.

Basados en estos resultados y en otros, se sugiere que la conducta sexual en las ratas macho se organiza neonatalmente por el estradiol y se activa cuando adultos por la T o sus metabolitos (Bakker, 1993). Si existe una disminución de la hormona que participa en la regulación de la CSM, la conducta sexual normal se altera permanentemente.

Es claro que la expresión normal de la CSM durante la edad adulta requiere de la integración de varios circuitos neuronales. Se sabe que los sistemas de neurotransmisión

participan en la estimulación de la CSM, y que requiere de los efectos organizacionales de las hormonas esteroides durante la etapa temprana para que ejerzan sus efectos durante la edad adulta.

Se ha mostrado que las ratas hembra despliegan el patrón de monta y de intromisión, patrones similares en los machos (Beach, 1975). Bajo condiciones experimentales es posible que las ratas hembra desplieguen el patrón de eyaculación, esto se ha evaluado con androgenización neonatal (Baum, 1979), con el tratamiento de paraclorofenilalanina, o bien con la administración de testosterona o estrógenos (Barfield y Krieger, 1977).

Así, de este modo el isomorfismo de los patrones motores que participan en la CSM en ambos sexos, podría sugerir un origen común del circuito nervioso que regula los patrones de monta, intromisión y eyaculación tanto en machos como en hembras (Moralí y cols. 1985). El isomorfismo sexual de los patrones motores de la conducta copulatoria en la rata señalan que la organización del substrato nervioso para esta conducta esta controlada genéticamente (Arrieta y cols. 2000; Baum y cols. 1992). Esta idea apoya los resultados encontrados en este estudio, en los que la administración neonatal de un antiestrógeno a ratas macho provoca la desmasculinización y feminización de la conducta sexual de estas ratas. El hecho de que las ratas macho desmasculinizadas con Tx no desplieguen el patrón de eyaculación, podría ser interpretado por la participación que tienen los andrógenos perinatales en la organización de la red nerviosa que involucra este patrón motor. En este contexto, la administración de Tx podría inhibir las conexiones sinápticas de la red nerviosa eyaculatoria. De este modo, el tratamiento neonatal con Tx probablemente tenga un efecto sobre el desarrollo de la respuesta de eyaculación por una alteración de la respuesta de este sistema tal como el patrón de monta y de intromisión que ocurre con suficiente frecuencia (Fig. 10) y que sobrepasa el umbral de

eyaculación (Fig. 11), probablemente debido a una deficiencia en el mecanismo que controla el patrón de eyaculación *per se* (Barfield y Krieger, 1977).

De estos resultados surgieron algunas preguntas, una de ellas que nos propusimos contestar fue: ¿dependiendo del grado de deterioro que haya causado el Tx administrado neonatalmente en los machos, sobre los distintos sistemas de neurotransmisión que participan en la regulación de la conducta sexual masculina, la oxotremorina, el 8OHDPAT, yohimbina y apomorfina serán capaces de estimular la CSM en animales adultos desmaculinizados?.

Se sabe que los esteroides gonadales diferencian los sistemas de neurotransmisión, pero es muy probable que actúen como neuromoduladores de la neurotransmisión en estos períodos tempranos del desarrollo, y que la transmisión química sea el proceso a través del cual las hormonas gonadales realizan sus efectos morfológicos facilitando o inhibiendo contactos sinápticos estables al modular la transmisión. Así, existen evidencias que sugieren que los neurotransmisores podrían participar en el desarrollo de las diferencias sexuales del SNC, ya que la administración prenatal de drogas que afectan sistemas adrenérgicos, colinérgicos (Meyerson y cols. 1979; McEwen y Parsons, 1982), serotoninérgicos, dopaminérgicos (Döhler, 1991) y gabaérgicos (Segovia y cols. 1991; Rodríguez- Zafra y cols. 1993; Del Cerro y cols. 1995) son capaces de modificar el desarrollo de las diferencias sexuales en el cerebro y de las conductas reproductoras.

De tal manera, que ha aparecido en la literatura una preocupación por el conocimiento de la farmacología de la conducta sexual, útil para el tratamiento de trastornos de la sexualidad, más recientemente algunos grupos de investigación han estudiado la posibilidad de que los sistemas de neurotransmisión pudieran diferenciarse sexualmente por la acción organizadora de las hormonas gonadales.

Aunque en este estudio sólo una dosis de cada fármaco fue evaluada, se ha reportado que la dosis utilizada para yohimbina (Clark y cols. 1985; Smith y cols. 1987), oxotremorina (Retana-Márquez y cols. 1993), 8OHDPAT (Haensel y cols. 1991) y apomorfina (Melis y cols. 1994) inducen una clara y significativa estimulación de los parámetros de la conducta copulatoria cuando se lleva a cabo las pruebas de actividad sexual en animales intactos (Bitran y Hull. 1987). Así lo corroboran nuestros resultados, en los que al administrar estos fármacos a ratas macho CON, tienen un efecto estimulador sobre la regulación de la conducta sexual masculina (Tabla 4).

Hasta el momento, se sabe que la OXO es un agonista de los receptores colinérgicos muscarínicos M_1 postsinápticos que al imitar la acción de la acetilcolina (Feldman y cols. 1997), estimula las vías colinérgicas que intervienen en la integración de la conducta sexual masculina. Además de que los receptores muscarínicos situados en el APM la cual participa en la motivación y ejecución de la CSM son estimulados por el agonista muscarínico OXO, facilitando la expresión de la CSM en la rata (Hull y cols. 1988a). El tratamiento sistémico de OXO a machos intactos estimula el umbral eyaculatorio, disminuyendo el NI que preceden a la eyaculación, así como la LE (Retana- Márquez y cols.1993).

Nuestros resultados muestran que la administración de OXO a ratas macho adultas (CON) tratadas neonatalmente con aceite de maíz corroboran que este fármaco tiene un efecto facilitador sobre la expresión de la CSM; al disminuir significativamente la LE ($p < 0.05$, según prueba de Dunnett; Fig. 17) NM ($p < 0.05$, según prueba de Dunnett; Fig. 18) y NI ($p < 0.01$, según prueba de Dunnett's; Fig. 19). La OXO no es capaz de estimular la CSM de ratas desmasculinizadas que fueron tratadas neonatalmente con Tx (Fig. 17).

El 8-OHDPAT es un agonista de los receptores presinápticos 5-HT_{1A}, que al estimularlos inhibe la liberación de serotonina a nivel de la sinapsis (Feldman y cols. 1997), lo que tiene un efecto estimulador sobre la CSM, causando una disminución del NI que preceden a la eyaculación y la LE esta disminuída en la rata macho (Haensel y cols. 1993).

En este estudio la administración de 8-OHDPAT, a ratas macho adultas (CON) produjo una disminución de la LM ($p < 0.01$, según prueba de Dunnett') (Fig. 15), LE ($p < 0.05$, según prueba de Dunnett', Fig. 17), NM y NI ($p < 0.01$, según prueba de Dunnett', Fig. 18. 19) además de incrementar ($p < 0.01$, según prueba de Dunnett') la FE (Fig. 20); por consiguiente este agonista serotoninérgico facilitó la CSM.

Este efecto facilitador de la 8OHDPAT sobre la CSM, no se observa cuando este fármaco se administra a los SsE tratados con el antiestrógeno, por lo tanto la 8OHDPAT, no revierte la desmasculinización de estas ratas macho adultas.

La YH es un antagonista de los receptores presinápticos α_2 adrenérgicos que al ser bloqueados facilita la liberación de noradrenalina (Feldman y cols. 1997) permitiendo la acción que tienen la vías noradrenérgicas en la regulación de la conducta sexual masculina.

Los efectos de 2mg/kg de YH sobre la conducta copulatoria de ratas macho, evidencian una disminución del NI y de la LE además de incrementar la eficiencia copulatoria (Koskinen y cols. 1991). Así lo corroboran nuestros resultados, la administración de YH a ratas macho adultas (CON), reduce el NI ($p < 0.01$, según prueba de Dunnett, Fig. 19) y disminuye la LE ($p < 0.01$, según prueba de Dunnett: Fig. 17). Pero no es capaz de provocar un efecto estimulador sobre la LM. LI. LE. NM. NI y FE de ratas macho desmasculinizadas que fueron tratadas durante la etapa neonatal con Tx. Sin embargo es el único fármaco capaz de

incrementar al 100% el porcentaje de sujetos que montan e intromiten ($p < 0.02$, prueba de Fisher) cuando se comparan con el grupo control.

La APO es un agonista dopaminérgico de los receptores D_2 presinápticos que al actuar sobre ellos facilita la liberación de dopamina (Feldman y cols. 1997). La administración de APO revierte los efectos inhibitorios sobre la conducta, producidos por la castración (Mälmnas, 1973). Microinyecciones en el APM facilitan varios parámetros de la CSM, mientras que la administración de un antagonista dopaminérgico (cis-flupentixol) la inhibe (Warner y cols. 1991). En nuestros resultados encontramos que la administración de APO a ratas macho adultas (CON) reduce el NM ($p < 0.05$, según prueba de Dunnett, Fig. 18), el NI y la LE ($p < 0.01$, según prueba de Dunnett, Fig. 19, 20) facilitando el patrón copulatorio de estas ratas. Se ha sugerido que receptores dopaminérgicos en el APM regulan factores motivacionales de la conducta sexual (Warner y cols. 1991).

Cuando la APO se administra durante la edad adulta a ratas tratadas neonatalmente con Tx12.5 reduce el NI ($p < 0.01$, según prueba de Dunnett, Fig. 19) comparado con el grupo control, pero APO no tiene ningún efecto estimulador sobre los otros parámetros de la cópula de estas ratas desmasculinizadas.

Existe poca información de la actividad sexual de la rata macho tratada neonatalmente con Tx y su seguimiento de la conducta sexual a lo largo de la vida del animal, además de poder restituir esta deficiencia de actividad sexual con la administración de neurotransmisores que se conoce tienen un efecto facilitador sobre la regulación de la CSM (Hull y cols. 1988a, 1988b; Retana-Márquez, 1993; Clark y cols. 1985; Smith y cols. 1987; Haensel y cols. 1991; Melis y cols. 1994).

Estos datos muestran que esta deficiencia en la CSM puede no ser completamente restituida con la administración de drogas, lo que sugiere que la manipulación hormonal podría tener una conexión entre la desmasculinización y las deficiencias en los sistemas de neurotransmisión producidos por tratamiento neonatal con Tx.

Las acciones bioquímicas de los esteroides sobre las neuronas involucran principalmente acciones genómicas, expresadas a través de la síntesis de proteínas. En tal caso la actividad de síntesis de proteínas podría ser responsable de la transformación sintética y de la degradación enzimática que regula la síntesis de neurotransmisores, también tiene efectos sobre los cambios en los niveles de receptores o afinidad específica por los sistemas de neurotransmisión (Anderson, 1982).

Los presentes resultados señalan que la estimulación de la CSM en ratas tratadas neonatalmente con Tx, a través de la activación de receptores muscarínicos probablemente requieran de la presencia de T. En este estudio la OXO no fue lo suficientemente capaz de restituir la deficiencia de la CSM, de estas ratas desmasculinizadas. Se ha reportado que en ausencia de T, la OXO por sí misma no es capaz de mejorar la conducta sexual (Retana-Márquez, 1997).

La serotonina ha sido propuesta como un neurotransmisor que participa en los mecanismos de diferenciación sexual principalmente en el hipotálamo (Giulian y cols. 1973).

Se sabe que el Tx compite con los sitios de unión al estrógeno, en este estudio se mostró que existe una desmasculinización de la CSM de ratas tratadas neonatalmente con Tx y que el 8OHDPAT no es competente para revertir este efecto desmasculinizante.

Se ha sugerido que los estrógenos cerebrales son requeridos para un desarrollo serotoninérgico normal, y esto puede ser relacionado con la masculinización cerebral. Por otro lado la serotonina es uno de los principales neurotransmisores involucrados en la masculinización sexual inducida por aromatización (González y Leret, 1992). También el efecto de 8OH-DPAT sobre la conducta de monta depende de la presencia de T (Haensel y cols. 1993) y se sabe que el Tx bloquea a la T, inhibiendo la CSM (Bonsall y cols. 1991).

Estudios hechos en rata han mostrado que la YH incrementa la síntesis de noradrenalina y dopamina mientras que disminuye la síntesis de serotonina en el cerebro de la rata (Smith y cols. 1987). Estos neurotransmisores están regulando la CSM de la rata macho.

Sin embargo en este estudio la YH potente antagonista α_2 noradrenérgico, no tiene efectos estimuladores sobre la CSM de ratas macho tratadas neonatalmente con Tx. Sin embargo de todos los fármacos utilizados en este estudio, es el único que pudo revertir el efecto inhibitorio en el %SsM y en %Ssl (Fig. 13). En este contexto, las investigaciones de Clark señalan que la T no es requerida para mejorar la CSM por YH (Clark, y cols. 1985).

También se sugiere que el 8OHDPAT agonista de los receptores 5HT_{1A} activan a los receptores α_2 noradrenérgicos (Haensel y cols. 1993). La ausencia de esteroides gonadales llevan a una disminución de noradrenalina al limitar la disponibilidad de cofactores que participan en las rutas biosintéticas de este neurotransmisor.

Por lo tanto, los esteroides sexuales ejercen sus efectos sobre los sistemas dopaminérgico, serotoninérgico, noradrenérgico y colinérgico actuando sobre la membrana celular mediante una acción genómica. Los estrógenos disminuyen la actividad de las neuronas dopaminérgicas hipotalámicas (Lookingland y Moore, 1984) y se sabe que los

agonistas dopaminérgicos facilitan varios aspectos de la CSM de ratas macho (Hull y cols. 1988b).

En este estudio el agonista dopaminérgico de los receptores D₂ apomorfina no tuvo efectos estimuladores sobre los parámetros copulatorios de ratas desmasculinizadas tratadas neonatalmente con Tx.

El contenido de catecolaminas puede ser modificado por la manipulación de esteroides durante la etapa neonatal. La ausencia de esteroides gonadales llevan a una disminución de noradrenalina al limitar la disponibilidad de cofactores que participan en las rutas biosintéticas de este neurotransmisor, asimismo los esteroides participan en el desarrollo de procesos axonales y conexiones catecolaminérgicas (Toran-Allerand, 1984).

La administración de agonistas y antagonistas de neurotransmisores que se sabe tienen un efecto facilitador sobre la CSM, en este estudio se corroboraron; sin embargo al administrar OXO, 8OHDPAT, YH y APO durante la edad adulta a ratas desmasculinizadas con Tx, éstos fármacos no fueron capaces de revertir este efecto desmasculinizante.

Asimismo el Tx participa en la modulación de las catecolaminas, particularmente la DA: es un importante modulador de la función dopaminérgica en el sistema nigroestriatal (McDermott y cols. 1998). En el cuerpo estriado, el Tx modifica la unión de los receptores D₂ dopaminérgicos (Toney y Katzenellenbogen, 1987) y produce una deficiencia en la síntesis de DA (Baski y cols. 1985).

Estos efectos moduladores de este antiestrógeno sobre el sistema nigroestriatal están determinados: primero, porque el sistema nigroestriatal representa un importante blanco para

los estrógenos (Van Hartesveldt y Joyce, 1986). Segundo, en la rata esta área concentra gran cantidad de estradiol (Bixo y cols. 1986). Tercero, se ha mostrado que el Tx y los estrógenos interaccionan sobre la función dopaminérgica nigroestriatal (McDermott y cols. 1997).

Además los efectos de los estrógenos sobre la transcripción, regulada por el receptor a estrógeno y los efectos antiestrogénicos del Tx resulta de la acción competitiva sobre el receptor a estrógeno, los estrógenos y antiestrógenos pueden afectar los procesos celulares a través de otros mecanismos.

El Tx también puede ejercer sus efectos en el SNC, mediante mecanismos no genómicos (Wiseman, 1994). Asimismo el Tx puede modificar los sistemas colinérgico, histaminérgico y dopaminérgico, que afecta la acción de la calmodulina (Lam, 1984) y la actividad de la proteína cinasa "C" (O'Brian y cols. 1985).

Nuestros resultados mostraron que no es posible revertir el efecto desmasculinizante del Tx neonatal, con la administración de drogas que tienen un efecto facilitador sobre la expresión de la cópula de la rata macho.

Cuando se administra Tx a ratas intactas produce una deficiencia de las vías catecolaminérgicas, inhibiendo la liberación de DA (Kritzer y Pugach, 2001). Estos resultados sugieren que una depresión sobre las aferentes mesocorticales de DA seguidas de la gonadectomía están relacionadas con los cambios en la activación de los estrógenos (Kritzer, 2000).

Por otro lado el Tx antagoniza la actividad de los receptores periféricos y centrales (Chazal y cols. 1975) y antagoniza la actividad transcripcional regulada por los receptores nucleares (Kritzer y Pugach, 2001).

Como se ha mencionado el Tx tiene propiedades antiestrogénicas y antagoniza diversos procesos celulares, esto podría explicar el efecto irreversible y permanente de la administración neonatal del Tx sobre la CSM deteriorada, administrado durante periodos los cuales son críticos para que lleve a cabo la acción del estrógeno que regula la conducta sexual masculina de las ratas.

Además, otro de los efectos más importantes del Tx es que induce apoptosis, de tal modo que probablemente la actividad antiproliferativa del Tx, podrían depender de la integración de la información entre la señal de transducción en la membrana celular del receptor a estrógeno y la regulación de genes por el receptor a estrógenos (Chung y cols. 2002). Por lo tanto es muy posible que la administración neonatal de Tx, en un momento en el cual el cerebro esta llevando a cabo la acción organizacional de estructuras nerviosas, produjera muerte neuronal en las estructuras que participan en la regulación de la CSM, además de afectar o de inhibir vías que involucran axones y proyecciones aferentes que interaccionan con los sistemas de neurotransmisión que también participan en el despliegue de esta conducta copulatoria. De tal modo que al llegar a la edad adulta estas ratas tratadas con Tx, y tener que darse el efecto activacional de las hormonas esteroides no es posible que se de la señal, debido a que no existe la información para que se active esta conducta, por los efectos no sólo a nivel genómico, que determinó durante la etapa neonatal el Tx, inhibiendo la transcripción, efecto que bloqueará la síntesis de proteínas y esta a su vez, no lleve a cabo el

efecto celular de la hormona. Además de involucrar estas acciones genómicas; sino también mecanismos no genómicos, los cuales participan en muchos procesos biológicos (Mandlekar y Kong, 2001).

Por estas razones, no se lleva a cabo la transmisión sináptica y no es posible que se de el despliegue de la conducta sexual masculina durante la etapa adulta de ratas que fueron tratadas neonatalmente con Tx, en la etapa crítica de diferenciación sexual.

11. CONCLUSIÓN

La administración neonatal de Tx produce una desmasculinización y feminización de la CSM de ratas macho adultas.

Nuestros resultados evidenciaron que las alteraciones de la conducta copulatoria en la rata macho adulta, están asociadas con la administración de Tx12.5 y Tx100 durante la etapa neonatal, disminuyendo el aspecto motivacional (aumento de la latencia de monta, intromisión, Fig. 9A, 9B), lo mismo que el componente ejecutorio (aumento en el número de montas, intromisiones y disminución en la tasa de aciertos, Fig. 10A, 10B, 12), el umbral eyaculatorio (incremento en la latencia de eyaculación, Fig. 9C), y el potencial copulatorio (disminución en la frecuencia de eyaculación, Fig. 11). Además, afecta el porcentaje de sujetos sexualmente activos; disminuyendo el %SsM, %SsI y el %SsE (Fig. 7, 8).

En los machos tratados neonatalmente con Tx12.5 y Tx100, sólo el 8% y 3% de los SsE eyaculan (Fig. 8). Es muy importante señalar que nuestros resultados muestran una reducción notable no sólo sobre el porcentaje de sujetos que eyaculan, sino también sobre el porcentaje de sujetos que montan e intromiten en los machos tratados neonatalmente con Tx en ambos esquemas, comparado con el grupo control.

La administración de dos dosis de Tx 12.5 y Tx 100 durante la etapa neonatal a machos, produce la feminización de la conducta, determinada por la adquisición de características femeninas que se reflejan con el incremento del coeficiente de lordosis en estos SsE comparado con los machos control (Tabla 3).

Después de corroborar la pérdida de la CSM existentes con estos tratamientos durante la edad neonatal y con la intención de revertirlas se administró oxotremorina (OXO), un

agonista colinérgico muscarínico de los receptores M_1 , 8-hidroxi- di-(2-n-propil)aminotetralina (8OHDPAT), agonista de los receptores $5-HT_{1A}$, yohimbina (YH) un antagonista α -2 adrenérgico, apomorfina agonista de los receptores D_2 , a ratas tratadas neonatalmente con Tx y con solución salina. Cuyo efecto se conoce que es facilitatorio sobre la regulación de la CSM, nuestros resultados así lo corroboraron, ya que la administración de estos fármacos a ratas macho CON si facilitan los parámetros de la cópula (Tabla 4).

No encontrándose que estas drogas tuvieran un efecto estimulador en estos machos desmasculinizados (Tx12.5 y Tx100), debido que este efecto es organizacional y no es posible revertirlo durante la edad adulta.

Por lo tanto la administración neonatal de dos dosis de Tx (12.5 y 100 μ g/kg) desmasculinizó y feminizó la conducta sexual de ratas macho adultas, y no pudo ser revertido por la administración de drogas que se conoce tienen efectos facilitatorios sobre la conducta sexual masculina de ratas adultas.

12. REFERENCIAS.

1. Agmo, A., Villalpando, A., Picker, Z., Fernández, H. 1995. Lesions of the medial prefrontal cortex and sexual behavior in the male rat. *Brain Res* 69(1-2): 177-86.
2. Agmo, A. 1997. Male rat sexual behavior. *Brain Res Protoc* 1:203-209.
3. Anderson, J. 1982. The effects of steroid hormones on gene transcription. En Goldberger, R. F. Yamamoto (eds). *Hormone action*. New York Plenum Press, 3:169-212.
4. Anderson, R. H., Fleming, D. E., Rhees, R. W. y Kinghorn, E. 1986. Relationships between sexual activity, plasma testosterone and the volume of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in prenatally stressed and non-stressed rats, *Brain Res* 370: 1-10.
5. Arai, Y., Sekine, Y., y Murakami, S. 1996. Estrogen in the developing sexually dimorphic preoptic area in female rats. *Neurosci Res* 25(4):403-407.
6. Arendash, F. W. y Gorski, R. A. 1982. Enhancement of sexual behavior in female rats by neonatal transplantation of brain tissue from males. *Science* 217(4566):1276-1278.
7. Arendash, F. W. y Gorski, R. A. 1983. Effects of discrete lesions of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area or other medial preoptic regions on the sexual behavior of male rats. *Brain Res Bull* 10(1): 147-154.
8. Arrieta, I., Camacho-Arroyo, I., Mendoza-Rodríguez, C. A., Cerbón, M. A. 2000. c-Fos gene expression in the hypothalamus and the preoptic area of defeminized rats, *Brain Res* 867(2)100-106.

9. Avissar, S. y Sokolovsky M. 1981. Studies of muscarinic receptors in mouse and rat hypothalamus: a comparison of sex and ciclical differences, *Neuroendocrinol* 32: 295-302.
10. Bakker, J. Brand. T., Van Ophemert, J. y Slob, A. K. 1993. Hormonal regulation of adult partner preference behavior in neonatally ATD-treated male rats, *Behav Neurosci* 107: 480-487.
11. Balthazart, J., Tlemcani, O. y Ball, G. F. 1996. Do sex differences in the hormonal induction of reproductive behavior? What 25 years of research on the Japanese quail tell us, *Horm Behav* 30(4):627-661.
12. Balthazart, J., Baillien, M. y Ball, G. F. 2001. Phosphorylation processes mediate rapid changes of brain aromatase activity, *J Steroid Biochem Mol Biol* 79(1-5):261-277.
13. Barfield, R. J. y Krieger, M. S. 1977. Ejaculatory and postejaculatory behavior of male and female rats: effect of sex hormones and electric shock, *Physiol Behav* 19:203-208
14. Barraclough, C. A. 1961. Production of anovulatory sterile rats by single injection of testosterone propionate, *Endocrinol* 68: 62-67.
15. Barraclough, C. A., Leathem, J. H. 1954. Infertility induced in mice by single injection of testosterone propionate, *Proc Soc Exp Biol Med* 85: 673-674.
16. Baski, S. N., Hughes, M. J. y Light, K. E. 1985. Alterations of dopamine metabolism in different brain regions of the rabbit by estradiol and tamoxifen, *Neurosc* 14:1053-1059.
17. Baulieu, E. E. y Robel, P. 1990. Neurosteroids: a new brain function?. *J Steroid Biochem Mol Biol* 37: 395-398.

18. Baum, M. J. 1979. Differentiation of coital behavior in mammals: A comparative analysis, *Neurosci Biobehav* 3:265-284.
19. Baum, M. J. y Everitt, B. J. 1992. Increased expression of *c-fos* in the medial preoptic area after mating in male rats: role of afferent inputs from the medial amygdala and midbrain central tegmental field, *Neurosci* 50:627-646.
20. Beach, F. A. 1967. Cerebral and hormonal control of reflexive mechanisms involved in copulatory behavior, *Physiol Rev* 47: 289-316.
21. Beach, F. A. 1975. Hormonal modification of sexually dimorphic behavior, *Psychoendocrinol* 1:3-6.
22. Beach, F. A., Holtz, A. M. 1946. Mating behavior in male rats castrated at various ages and injected with androgen, *J Exp Zool* 101: 91-142.
23. Beach, F. A. y Nucci, L. P. 1970. Long-term effects of testosterone phenylacetate on sexual morphology and behavior in castrated male rats, *Horm Behav* 1: 223-234.
24. Beato, M. 1989. Gene regulation by steroid hormone, *Cell* 56:335-344.
25. Beyer, C. 1976. Neuroendocrine factors and behavior, *Bol Estud Med Biol* 29(4):181-185.
26. Bitran, D. y Hull, E. 1987. Pharmacological analysis of male rat sexual behavior, *Neurosci Biobehav Rev* 11: 365-389.

27. Bixo, M., Backstrom, T., Winblad, B., Seltam, G. y Anderson A. 1986. Comparison between pre and post-ovulatory distributions of oestradiol and progesterone in the brain of the PMSG-treated rat. *Acta Physiol Scand* 128:241-246.
28. Blanchard, R. J. y Blanchard, C. D. 1977. Aggressive behavior in the rat. *Behavioral Biology* 21:197-224.
29. Bloch, G. J. y Gorski R. A. 1988. Estrogen/progesterone treatment in adulthood affects the size of several components of the medial preoptic area in the male rat. *J Comp Neurol* 275: 613-622.
30. Bonsall, R. W., Clancy, A. N. y Michael, R. P. 1991. Effects of the non-steroidal aromatase inhibitor, fradizole, on the nuclear uptake of testosterone and its metabolites by brain and on sexual activity male rats. *J. Steroid Bioch Mol Biol* 38(1):49-57.
31. Breedlove, S. M. y Arnold, A. P. 1980. Hormone accumulation in a sexually dimorphic motor nucleus of the rat spinal cord. *Science* 210(4469): 564-566.
32. Brown-Grant, K. 1974. On "critical periods" during the postnatal development of the rat. *Colloques-del Institut Nationale de la Santé et de la Recherche Medicale INSERN* 32:357-376.
33. Bullock, B. C. Newbold, R. R., y McLachlan, J. A. 1988. Lesions of testis and epidymis associated with prenatal diethylstilbestrol exposure. *Environ Health Perspect* 77:29-31.
34. Calés, J. M., Sánchez-Santed, F., Pérez-Laso, C., Zafra-Rodríguez, M., Segovia-Santiago, y Guillamón, A. 1992. Effects of early postnatal sex steroids on acquisition and extinction of a continuously reinforced lever-pressing response, *Brain Res Bull* 28: 937-941.

35. Campbell, B. A., Riccio, D. C. y Rohnsbaugh, M. 1971. Ontogeny of learning and memory: research and theory, *Exp Neurol* 33(1):159-170.
36. Chazal, G., Faudon, M., Gogan, F. y Rotszejn, W. 1975. Effects of two estradiol antagonist upon the estradiol uptake in the rat brain and peripheral tissues, *Brain Res* 89(2):245-254.
37. Chiba, T. y Murata Y. 1985. Afferent and efferent connections of the medial preoptic area in the rat. A WGA-HRP study, *Brain Res Bull* 14: 261-272.
38. Christensen, L. W. y Gorski, R. A. 1978. Independent masculinization of neuroendocrine system by intracerebral implants of testosterone or estradiol in the neonatal female rat, *Brain Res* 146: 325-340.
39. Chung, Y. L., Sheu, M. L., Yang, S. C., Lin, C. H. y Yen, S. H. 2002. Resistance to tamoxifen-induced apoptosis is associated with direct interaction between Her2/neu and cell membrane estrogen receptor in breast cancer, *Int J Cancer* 97(3):306-312.
40. Clancy, A. N., Zumpe, D. y Michael, R. P. 1995. Intracerebral infusion of an aromatase inhibitor, sexual behavior and brain estrogen receptor –like immunoreactivity in intact male rats, *Neuroendocrinology* 61:98-111.
41. Clancy, A. N., Zumpe, D. y Michael, R. P. 2000. Estrogen in the medial preoptic area of male rats facilitates copulatory behavior, *Horm Behav* 38(2):86-93.
42. Clark, J. T., Smith, E. R. y Davidson, J. M. 1985a. Evidence for the modulation of sexual behavior by α -adrenoceptors in male rats, *Neuroendocrinol* 41: 36-43.
43. Clark, J. T., Smith, E. R. y Davidson, J. M. 1985b. Testosterone is not required for the enhancement of sexual motivation by yohimbine, *Physiol Behav* 35: 517-522.

44. Commins, D. y Yahr, P. 1984. Adult testosterone levels influence the morphology of a sexually dimorphic area in the mongolian gerbil brain. *J Comp Neurol* 224 : 132-140.
45. Crowley, W. R. y Lemlan, F. P. 1981. En "Neuroendocrinology of Reproduction" Adler, T. (eds), Plenum New York, 451-484.
46. Csaba, G., Dobozy, O. y Dallo, J. 1986. Influence of neonatal steroid (diethylstilbestrol, allylestrenol) treatment on the sexual behaviour of the rat adult, *Med Biol* 64: 193-195.
47. Csaba, G., y Karabélyos, C. 2001. The effect of a single neonatal treatment (hormonal imprinting) with the antihormones, tamoxifen and mifepristone on the sexual behaviour of adult rats, *Pharmacol Res* 43(6): 531-534.
48. Cuzick, J., Allen, D., Baum, M., Barrett, J., Clark, G., Kakkan, V., Melissari, E., Moniz, C., Moore, J., Parsons, V., Pemberton, K., Pitt, P., Richmond, W., Houghton, J. y Riley, D. 1993. Long term effects of tamoxifen. *Eur J Cancer* 29:15-21.
49. Dantchakoff V. 1935. Sur l'inversion sexuelle expérimentale de l'ébauche testiculaire chez l'embryon de poulet. *Acad Sci Paris*. 200:1983-1985.
50. Dantchakoff V. 1938. Role des hormones dans la manifestation des instincts sexuels, *Acad Sci Paris*, 296:945-947.
51. Davis, E. C., Popper, P., y Gorski, R. A. 1995. The role of apoptosis in sexual differentiation of the rat sexually dimorphic nucleus of the preoptic rat. *Brain Res* 734(1-2): 10-80.

52. Davis, E. C., Shryne, J. E., y Gorski, R. A. 1996. A revised critical period for the sexual differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in the rat, *Neuroendocrinology* 62(6): 579-585.
53. De Jonge, F. H., Louwerse, A. L., Ooms, M. P., Evers, P., Endert, E. y Van de Poll, N. E. 1989. Lesions of the SDN-POA inhibit sexual behavior of male wistar rats, *Brain Res Bull* 23: 483-492.
54. De Olmos, J. S., Alheid, G. F. y Beltramino, C. A., 1985. Amygdala in the rat nervous system. Forebrain and Midbrain, Paxinos, G. (eds), Academic Press, Sydney, 223.
55. Del Cerro, M. C., Izquierdo, M. A., Pérez-Laso, C., Rodríguez-Zafra, M., Guillamón, A. y Segovia, S. 1995. Early postnatal diazepam exposure facilitates maternal behavior in virgin female rats, *Brain Res Bull* 38: 143-147.
56. De Vries, G.J., Buijs, R.M., Van Leeuwen, F.W. 1984. Sex differences in vasopressin and other neurotransmitter systems in the brain. *Progr Brain Res* 61: 185-203.
57. Döhler, K. D. 1991. The pre- and postnatal influence of hormones and neurotransmitters on sexual differentiation of the mammalian hypothalamus, *Int Rev Citol* 131: 1-55.
58. Döhler, K. D., Coquelin, A., Davies, F., Hines, M., Shryne, J. E. y Gorski, R. A. 1984a. Pre-and postnatal influence of the testosterone propionate and diethylstilbestrol on differentiation of the sexually dimorphic nucleus on the preoptic area in male and female rats, *Brain Res* 302: 291-295.
59. Döhler, K. D., Coquelin, A., Davies, F., Hines, M., Shryne, J. Sickmöller, P. M., Jarzab, B. y Gorski, R. A. 1986. Pre-and postnatal influence of a estrogen antagonist and an androgen antagonist on the differentiation of the sexually dimorphic nucleus on the preoptic area in male and female rats, *Neuroendocrinol* 42: 443-448.

60. Döhler, K. D., Ganzenmüller, C. y Veit, C. 1993. The development of sex differences and similarities in brain anatomy, physiology and behavior is under complex hormonal control. En the Development of sex differences and similarities in behavior. Haug, M., Whalen, R., Aron, C., y Olsen, K., (eds) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 341.
61. Döhler, K. D., Hancke, J. L., Srivastava, S.S., Hofman, C., Shryne, J. E. y Gorski, R. A. 1984b. Participation of estrogens in female sexual differentiation of the brain; neuroanatomical, neuroendocrine and behavioral evidence, *Progr Brain Res* (61):99-117.
62. Döhler, K. D., Hines, M., Coquelin, A., Davis, F., Shryne, J. E. y Gorski, R. A. 1983. Hormonal influence on sexual differentiation of rat brain anatomy, *Tierarztl Prax* 11(4):543-550.
63. Döhler, K. D., Srivastava, S. S., Shryne, J. E., Jarzab, B., Sipos, A. y Gorski, R. A. 1984c. Diferentiation of the sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat brain is inhibited the postnatal treatment whit an estrogen antagonist, *Neuroendocrinol* 38: 297-301.
64. Dörner, G. 1980. Sexual diferentiation of the brain. *Vitam Horm* 80(38): 325-381.
65. Dörner, G. Gotz, F. y Döcke, W. D. 1983. Prevention of demasculinization and feminization of the brain in prenatally stressed male rats by perinatal androgen treatment, *Exp Clin Endocrinol* 81(1): 88-90.
66. Dörner, G. y Hinz, G. 1967. Homosexuality of neonatally castrated male rats following androgen substitution in adulthood. *Germ Med Mon* 12(6):281-283.

67. Dörner, G. y Hinz, G. 1978. Apparent effects of neurotransmitters on sexual differentiation of the brain without mediation of sex hormones, *Endokrinol* 71(1): 104-109.
68. Dörner, G., Hinz, G. Döcke, F., y Tönjes, R. 1977a. Effects of psychotropic drugs of differentiation in female rats. *Endokrinol* 70 (2): 113-123.
69. Dörner, G. y Staudt, J. 1968. Structural changes in the preoptic anterior hypothalamic area of the male rat. following neonatal castration and androgen substitution. *Neuroendocrinol* 4: 136-140.
70. Dörner, G. y Staudt, J. 1969a. Perinatal structural sex differentiation of the hypothalamus in rats. *Neuroendocrinol* 5: 136-140.
71. Dörner, G. y Staudt, J. 1969b. Structural changes in the hypothalamic ventromedial nucleus of the male rat. following neonatal castration and androgen treatment, *Neuroendocrinol* 4: 278-281.
72. Dörner, G., Staudt, J., Wenzel, J., Kventnansky, R. y Murgas, K. 1977b. Further evidence of teratogenic effects apparently produced by neurotransmitters during brain differentiation. *Endokrinol* 70 (3): 326-330.
73. Dragunow, M. y Preston, K. 1995. The role of inducible transcription factors in apoptotic nerve cell death, *Brain Res Rev* 21:1-28.
74. Eck, E. y Nabel, G. 1991. Antisense oligonucleotides for therapeutic intervention, *Curr Opin Biotechnol* 2(6): 897-904.

75. Feldman, R. S., Meyer, J. S. y Quenzer, L. F. 1997. Principles of Neuropsychopharmacology. En Publishers, Sinauer Associates (eds) Sunderland, Massachusetts, USA, 909
76. Fischette, C. T., Biegon, A. y McEwen B. S. 1983. Sex differences in serotonin receptor binding in rat brain, *Science* 222: 333-335.
77. Gill-Sharma, M. K., Balasinor, N. y Parte, P. 2001. Effect of intermittent treatment with tamoxifen on reproduction in male rats. *Asian J Androl* 3(2):115-109.
78. Gill-Sharma, M. K., Balasinor, N., Parte, P., Aleem, M. y Juneja, H. S. 2001. Effects of tamoxifen metabolites on fertility of male rat. *Contraception* 63(2):103-109.
79. Gill-Sharma, M. K., Dsouza, S., Padwal, V., Balasinor, N., Parte, P., Aleem, M. y Juneja, H. S. 2001. Antifertility effects of estradiol in adult of male rats, *J Endocrinol Invest* 24(8):598-607.
80. Gill-Sharma, M. K., Gopalkrishna, K., Balasinor, N., Parte, P., Jayaraman, S. y Juneja, H.S. 1993. Effects of tamoxifen on fertility of male rats, *J Reprod Fertil* 99(2):395-402.
81. Giulian, D., Pohorecky, L. A. y McEwen, B. S. 1973. Effects of gonadal steroids upon brain 5-hydroxytryptamine levels in the neonatal rats, *Endocrinol* 93:1329-1335.
82. González, M. y Leret, M. 1992. Role of monoamines in the male differentiation of the brain induced by androgen aromatization. *Pharmacol Biochem Behav* 41:733-737.
83. Gorski R. A. 1971. Gonadal hormones and the perinatal development of neuroendocrine function. En Martini, L. y Ganong, W. (eds), *Frontiers in neuroendocrinology*, Oxford University Press, 237-290, Nueva York.

84. Gorski, R. A., Gordon, J. H., Shryne, J. E. y Southam, A. M. 1978. Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain, *Brain Res* 148: 333-346.
85. Gorski, R. A. Harlan, R. E., Jacobson, C. D., Shryne, J. E. y Southam, A. M. 1980. Evidence for the existence of a sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat, *J Comp Neurol* 193:529-539.
86. Gorski, R. A. y Wagner, J. W. 1965. Gonadal activity and sexual differentiation of the hypothalamus, *Endocrinol* 76: 226-239.
87. Goy R. W. y McEwen B.S. 1980 Sexual Differentiation of the Brain. *Biol Reprod* 22(1):43-48.
88. Graham, S. H. y Chen, J. 2001. Programmed cell death in cerebral ischemia, *J Cereb Blood Flow Metab* 21(2):99-109.
89. Grossman, R., Diez-Guerra, F. J., Mansfield, S. y Dyer, R. G., 1987. Neonatal testosterone modifies LH secretion in the adult female rat by altering the opioid-noradrenergic interaction in the medial preoptic area. *Brain Res* 415: 205-210.
90. Haensel, S. M., Mos, J., Olivier, B. y Slob K. 1991. Sex behavior of male and female rats affected by the serotonin agonist 8-OH-DPAT, *Pharmacol Biochem Behav* 40:221-228.
91. Haensel, S. M., Mos, J., Van der Schoot, P. y Slob K. 1993. Testosterone is required for stimulatory effects of 8-OH-DPAT on sexual behavior in castrated male. *Eur J Pharmacol* 233:187-192.

92. Harlan, R. E., Gordon, J. H., y Gorski, R. A. 1979. Sexual differentiation of the brain: implications for neuroscience, *Horm Res* 10(2-3):112-122.
93. Harms, C., Lautenschlager, M., Bergk, A., Katchanov, J., Freyer, D., Kapinya, K., Herwig, U., Megow, D., Dirnagl, U., Weber, J. R., Hortnagl, H. 2001. Differential mechanisms of neuroprotection by 17 beta-estradiol in apoptotic versus necrotic neurodegeneration, *J Neurosci* 21(8):2600-2609.
94. Harper, M. J. y Walpole, A. L. 1966. Contrasting endocrine activities of cis and trans isomers in a series of substituted triphenyl ethyl-enes, *Nature* 212: 87-95.
95. Higa, G. M. 1994. Tamoxifen: 25 year perspective, *Am J Hosp Pharm* 51:400-403.
96. Hlinak, Z. 1983. Precopulatory behavior of male laboratory rats in puberty and adulthood. *Activ Nerv Sup* 25:180-181.
97. Hlinak, Z. 1986. Precopulatory behavior of laboratory rat: an ethological approach, *Activ Nerv Sup* 28:108-116.
98. Howell, A. 2001. Preliminary experience with pure antiestrogens. *Clin Cancer Res* 7(12Suppl):4369s-4375s: discussion 4411s-44412s.
99. Hsu, C., Yang, S. L., Hsieh, Y. L., Lue, S. I., Hsu, H. K., Peng, M. T. 1998. Enlarging effects of estradiol on the nuclear volume of neurons in the hypothalamus during aging, *Gerontol* 44 (3):140-143.
100. Hsu, H. K., Yang, R. C., Shih, H. C., Hsieh, Y. L., Chen, U. Y. y Hsu, C. 2001. Prenatal exposure of testosterone prevents SDN-POA neurons of postnatal male rats from apoptosis through NMDA receptor. *J Neurophysiol* 86 (5):2374-2380.

- 101.Hull, E. M., Bitran, D., Pehek, E. A., Warner, R. K., Holmes, G. M., Band, L. C. y Bazzett, T. 1986. Intracranial infusions of a cholinergic antagonist affect male copulatory behavior, Conference Reprod Behav Abstr pp 57.
- 102.Hull, E. M., Bitran, D., Pehek, E. A., Holmes, G. M., Warner, R. K., Band, L. y Clemens, L. 1988b. Brain localization of a cholinergic influence on male sexual behavior in rats: Agonists, Pharmacol Biochem Behav 31: 169-174.
- 103.Hull, E. M., Bitran, D., Pehek, E. A., Warner, R. K., Holmes, G. M., Band, L., Bazzett, T. y Clemens, L. 1988b. Brain localization of cholinergic influence on male sexual behavior in rats: Antagonists, Pharmacol Biochem Behav 31: 175-178.
- 104.Hull, E. M., Nishita, J. K., Bitran, D. y Dalterio, S. 1983. Perinatal dopamine-releate drugs demasculinize rats, Science 224: 1011-1013.
- 105.Iguchi, T. y Ohta, Y. 1995. Cellular effects of early exposure to tamoxifen, Int Rev Cytol 60:1-52.
- 106.Jacobson, C. D., Csernus, Y. J., Shryne, J. E. y Gorski, R. A. 1981. The influence of gonadectomy, androgen exposure or agonadal graft in the neonatal rat on the volume of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area, J Neurosc 10: 1142-1147.
- 107.Jarzab, B. y Döhler, K. D. 1984. Serotonergic influences on sexual differentiation of the rat brain, Progr Brain Res 61:112-126.
- 108.Jarzab, B. M. Kaminski., E. Gubala., W. Achteik., J. Wagiel y D. Döhler. 1990. Postnatal treatment of rats with the β_2 -adrenergic agonist salbutamol influences the volume of the sexually dimorphic nucleus in the preoptic area, Brain Res 516: 257-262.

109. Jarzab, B. M., Lindner, G., Lindler, T., Sickmüller, P. M., Geerlings, H. y Döhler, K. D. 1986. Adrenergic influences on sexual differentiation of the rat brain, *Monogr Neural Sci* 12:109-116.
110. Jarzab, B., Sickmüller, P. M., Geerlings, H. y Döhler, K. D. 1987. Postnatal treatment of rats with adrenergic receptors agonist or antagonist influences differentiation on sexual behaviour, *Horm Behav* 21: 478-492.
111. Jost, A. 1953. Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypophyseal hormones, *Rec Progr Horm Res* 8: 379-418.
112. Jost A. 1961. The role of fetal hormones in prenatal development, *The Harvey Lectures*, 55, 201-226.
113. Jost, A. 1972. A new look at the mechanisms controlling sexual differentiation in mammals, *Johns Hopkins Med J* 130: 38.
114. Jordan V. C., Collins, M. M., Rowsby, L. y Prestwich, G. 1977. A monohydroxylated metanolate of tamoxifen with potent antioestrogenic activity, *J endocrinol* 75(2):305-316.
115. Kartha, K. N. y Ramakrishna, T. 1996. The role dimorphic medial area the hypothalamus in the sexual behavior of male and female rats, *Physiol Res* 45(6):459-466.
116. Kawata, M., K. Yuri y Morimoto, M. 1994. Steroid hormone effects on gene expression, neuronal structure, and differentiation. *Horm Behav* 28(4): 477-482.
117. Kerchner, M., Malsburry, C. W., Ward, O. B. y Ward I. L. 1995. Sexually dimorphic areas in the rat medial amygdala: resistance to the demasculinizing effect of prenatal stress, *Brain Res* 672(1-2):251-60.

118. Kerr, J. F. y Searle, J. 1973. Deletion of cells by apoptosis during castration-induced involution of the rat prostate. *Cell Pathol* 13:87-102.
119. Kerr, J. F., Winterford, C. M. y Harmon, B. V. 1994. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73:2013-2026.
120. Koopman P, Gubia J, Vivian N, Goodfellow P, y Lovell-Badge R. 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 351(6322): 171-121.
121. Koskinen, I., Hendricks, S., Yells, D., Fitzpatrick, D. y Graber, B. 1991. Yohimbine and naloxone: effects on male rat sexual behavior. *Physiol Behav* 50:589-593.
122. Kravitz, E. A. 2000. Serotonin an agresión: insights gained from a lobster and speculations on the role of amine neurons in a complex behavior. *J Comp Physiol* 186(3):221-238.
123. Kritzer, M. 2000. Effects of acute and chronic gonadectomy on the catecholamine innervation of the cerebral cortex in adult male rats: insensitivity of axons immunoreactive for dopamine-beta-hydroxylase to gonadal steroids, and differential sensitivity of axons immunoreactive for tyrosine hydroxylase to ovarian and testicular hormones. *J Comp Neurol* 427(4):617-633.
124. Kritzer, M. y Pugach, I. 2001. Administration of tamoxifen but not flutamide to hormonally intact, adult male rats mimics the effects of short-term gonadectomy on the catecholamine innervation of the cerebral cortex. *J Comp. Neurol* 431:444-459.
125. Lam, H.Y. 1984. Tamoxifen is a calmodulin antagonist in the activation of cAMP phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Comm* 118:27-32.

126. Larriva-Sahd, J., Rondán, A., Orozco-Estevcz, H. y Sánchez-Robles, M. R. 1993. Evidence of a direct projection of the vomeronasal organ to the medial preoptic nucleus and hypothalamus, *Neurosci Lett* 163: 45.
127. Larsson, K. 1956. *Conditioning and sexual behavior in the male albino rat*. Almqvist Wiksell, Stockholm.
128. Larsson, K. 1979. Features of the neuroendocrine regulation of masculine sexual behavior. In: Beyer C. (ed), *Endocrine Control of Sexual Behavior*, Raven Press, New York. pp. 77-163.
129. Lephart, E. D., Call, S. B., Rhee, R. W., Jacobson, N. A., Weber, K. S., Bledsoe, J. y Teuscher, C. 2001. Neuroendocrine regulation of sexually dimorphic brain structure and associated sexual behavior in male rats is genetically controlled, *Biol Reprod* 64(2):571-578.
130. Levy, J. R., Faber, K. A., Ayyash L., Hughes, CL. 1995. The effect of prenatal exposure to the phytoestrogen genistein on sexual differentiation in rats, *Proc Soc Exp Biol Med* 208(1):60-6.
131. Lonard, D. M. y Smith, C. L. 2002. Molecular perspectives on selective estrogen receptor modulators (SERMs): progress in understanding their tissue-specific agonist and antagonist actions, *Steroids* 67(1):15-24.
132. Loochingland K. J. y Moore, K. E. 1984. Effects of estradiol and prolactin on incerto-hypothalamic dopaminergic neurons in male rats, *Brain Res* 323:83-91.

133. Lund, T. D., Rhee, R. W., Setcheil, K. D., Lephart, E. D. 2001. Altered sexually dimorphic nucleus of the preoptic area (SDN-POA) volume in adult Long-Evans rats by dietary soy phytoestrogens. *Brain Res* 914(1-2):92-99.
134. Mahalik, T. J. y Owens, G. P. 1997. Cell death in the nervous system, *J Investig Dermatol Symp Proc* 2(1):14-18.
135. Malmnäs, C. O. 1973. Monoaminergic influence on testosterone activated copulatory behavior in the castrated male rats. *Acta Physiol Scand Suppl* 395: 1-128.
136. Marshall, E. 1994. Tamoxifen hanging in the balance, *Science* 264:1524-1527.
137. Martini L. 1978. Role of the metabolism of steroid hormones in the brain in sex differentiation and sexual maturation. en Dörner G. y Kawakami G. (eds.). *Hormones and brain development*. Elsevier, North-Holland Biomedical Press, 3-12. Amsterdam.
138. Mathews, G. A., y Arnold, A. P. 1991. Tamoxifen fails to block estradiol accumulation, yet is weakly accumulated by the juvenile zebra finch anterior hypothalamus: an autoradiographic study, *J Neurobio* 22: 970-975.
139. McCarthy, M. Brooks, P. J. Brown, H. E., Flanagan, L. M., Schwartz-Giblin, S. y Pfaff, D. 1992. Antisense oligodeoxynucleotides in behavioral neuroscience, *Neuroprot* 2: 67-74.
140. McCarthy, M., Schlenker, E. y Pfaff, D. 1993. Enduring consequences of neonatal treatment with antisense oligodeoxynucleotides to estrogen receptor messenger ribonucleic acid on sexual differentiation of rat brain, *Endocrinol* 133(2): 433-439.

141. McDermott, J. L., Anderson, L. I. y Dluzen, D. 1997. Interactive effects of tamoxifen and estrogen upon the nigrostriatal dopaminergic system. *Neuro endocrinol* 66:181-187.
142. McDermott, J. L., Anderson, L. I. y Dluzen, D. 1998. Tamoxifen alters dopamine output through direct actions upon superfused corpus striatal tissue fragments. *Neurochem Int* 32:299-307.
143. McEwen, B. S. 1988. Genomic regulation sexual behavior, *J Steroid Biochem* 30(1-6)179-83.
144. McEwen, B. S. y Parsons, B. 1982. Gonadal steroid action on the brain: neurochemistry and neuropharmacology. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 22: 555-598.
145. McLusky, N. J. y Naftolin, F. 1981. Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* 40(2): 1155-1160.
146. Meisel, R. L. y Sachs, B. D. 1994. The physiology of male sexual behavior. En: Knobil, E. y Neil J. (eds.) *The Physiology of Reproduction*, Raven Press, Ltd., New York. Capítulo 35, pp 3-105.
147. Melis, R. M., Mauri, A. y Argiolas A. 1994. Apomorphine-and Oxytocin-Induced penile erection and Yawning in intact and castrated male rats: Effects of sexual steroids. *Neuroendocrinol* 59: 349-354.
148. Moralí, G., Carrilo, L. y Beyer, C. 1985. Neonatal androgen influences sexual motivation but not the masculine copulatory motor pattern in the rat, *Physiol Behav* 34:267-275.

149. Neil, J. MacLusky, N. J. y Naftolin, F. 1981. Differentiation of the central nervous system, *Science* 211(20): 1294-1302.
150. Nett, S. T., Jorge-Rivera, J. C., Myers, M. Clark, A. S. y Henderson, L. P. 1999. Properties and sex-specific differences of GABA_A receptors in neurons expressing gamma1 subunit mRNA in the preoptic area of the rat, *J Neurophysiol* 81(1):192-203.
151. Nishizuka, M. 1976. Neuropharmacological study on the induction of hypothalamic masculinization in female mice, *Neuroendocrinol* 20:157-165.
152. Numan, M. 1988. Neural basis of maternal behavior in the rat, *Psychoneuroendocrinol* 13: 47-62.
153. Núñez, E., Sayu, L., Engelmann, F., Benassayag, C., Crepy, O. y Jayle M. F. 1971. Origine embryonnaire de la protéine sérique fixant l'œstradiol chez la ratte impubère, *Acad. Sci. Paris*, 273, 242-245.
154. O'Brian, C. A., Liskamp, R. M. Solomon, D. H. y Weinstein, I. B. 1985. Inhibition of protein kinase C by tamoxifen, *Cancer Res* 45:2462-2465.
155. Ohe, E. 1994. Effects of aromatase inhibitor on sexual differentiation of SDN-POA in rats. *Acta Obstet Gynecol JPN* 46(3):227-34.
156. Oppenheim, R. W. 1991. Cell death during development of the nervous system, *Ann Rev neurosci* 14:453-501.
157. Orensanz, L. M., Guillamón, A., Ambrosio, E., Segovia, S. y Aznara, M. C. 1982. Sex differences in alpha-adrenergic receptors in the rat brain. *Neurosci Letter* 30: 275-278.

158. Paredes, R. G. y Agmo, A. 1992. facilitation of sexual behavior shortly after electrolytic lesion of the medial preoptic area: what does it mean?. *Brain Res Bull* 29(1):125-128.
159. Paredes, R. G., López, M. E. y Baum, M. J. 1998. Testosterone augments neuronal Fos responses to estrous odors throughout the vomeronasal projection pathway of gonadectomized male and female rats. *Horm Behav* 33(1):48-57.
160. Parvizi N. y Naftolin F. 1977. Effects of catechol estrogens on sexual differentiation in neonatal female rats. *Psychoneuroendocrinol* 2: 409-411.
161. Patchev, V. K., Hayashi, S., Orikasa, C. y Almeida, O. F. 1995. Implications of estrogen-dependent brain organization for gender differences in hypothalamo-pituitary-adrenal regulation. *FASEB* 9(5):419-423.
162. Peiffer, A. 1936. Sexual differences of the hypophysis and their determination by the gonads. *Am J Anat* 58: 195-226.
163. Pfaff, D. W. 1966. Morphological changes in the brains of adult male rats after neonatal castration. *J Endocrinol* 36 (4): 415-416.
164. Pfaff, D. W. y Keiner, M. 1973. Atlas of estradiol-concentrating cells in central nervous system of the female rat, *J Comp Neurol* 151 : 121.
165. Pfaff, D. W. y Schwartz-Giblin, S. 1988. Cellular mechanisms of female reproductive behaviors, En *The Physiology of Reproduction*, Knobil, E. y Neil, J. (eds). Raven Press, New York, vol 2, 1487.
166. Phoenix, C. H., Goy, R. W., Gerall, A. A. y Young, W. C. 1959. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea-pig. *Endocrinol* 65: 369-382.

167. Pinilla, L., Barreiro, M. L., González, L. C., Tena-Sempere, M. y Aguilar E. 2002. Comparative effects of testosterone propionate, oestradiol benzoate, ICI 182,780, tamoxifen and raloxifene on hypothalamic differentiation in the female rat, *J Endocrinol* 172(3):441-448.
168. Pinos, H., Collado, P., Rodríguez-Zafra, M., Rodríguez, C., Segovia, S. y Guillamón, A. 2001. The development of sex differences in the locus coeruleus of the rat, *Brain Res Bull* 56(1):73-78.
169. Prince, K. N., Prince, J. S., Kinghorn, E. W., Fleming, D. E. y Rhees, R. W. 1998. Effects of sexual behavioral manipulation on brain plasticity in adult rats, *Brain Res Bull* 47(4):349-355.
170. Pritchard, K. I. 2001. The role tamoxifen and aromatase inhibitors/inactivators in postmenopausal patients, *Clin Cancer Res* 7(12suppl):4356s-4359s.
171. Raum, W. J., Marcano, M., y Swerdloff, R. S., 1984. Nuclear accumulation of estradiol derivative from the aromatization of testosterone is inhibited by hypothalamic beta-receptor stimulation in the neonatal female rat, *Biol Rep* 30: 388-396.
172. Raum, W. J. y Swerdloff, R. S., 1981. The role hypothalamic adrenergic receptor in preventing testosterone induced androgenization in the female rat, *Endocrinol* 109: 273-278.
173. Raynaud, J. P., Mercier-Bodard, C. y Baulieu, E. E. 1971. Rat estradiol binding plasma protein (EBP), *Steroids* 18: 767-788.
174. Register, B., Bethel, M. A., Thompson, N., Walmer, D., Blohm, A., Ayyash, L. y Hughes, C. Jr. 1995. The effect of neonatal exposure to diethylstilbestrol, coumestrol, and beta-

sitosterol on pituitary responsiveness and sexually dimorphic nucleus volume in the castrated rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 208(1):72-7.

175. Retana-Márquez S., Domínguez-Salazar, E. y Velázquez-Moctezuma J. 1993. Muscarinic and nicotinic influences on masculine sexual behavior in rats, *Pharmacol Biochem Behav* 44: 913-917.

176. Retana-Márquez S. y Velázquez-Moctezuma J. 1997. Cholinergic-androgenic interaction in the regulation of male sexual behavior in rats, *Pharmacol Biochem Behav* 56: 373-378.

177. Rhees, R. W., Al-Saleh, H. N., Kinghorn, E. W., Fleming, D. E., Lephart, E. D. 1999. Relationship between sexual behavior and sexually dimorphic structures in the anterior hypothalamus in control and prenatally stressed male rats, *Brain Res Bull* 50(3): 193-199.

178. Rhees, R. W., Shryne, J. E. y Gorski, R. A. 1990. Termination of the hormone-sensitive period for differentiation of sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in male and female rats. *Brain Res Dev Brain Res* 52(1): 17-23.

179. Rhoda, J. Corbier, P. y Roffi, J. 1984. Gonadal steroid concentrations in serum and hypothalamus of the rat at birth: aromatization of testosterone to 17 β -estradiol, *Endocrinology* 114(1):1754-1760.

180. Rodríguez-Zafra, M., De Blas, M. R., Pérez-Laso, C., Cáles, J. M., Guillamón, A. y Segovia, S. 1993. Effects of perinatal diazepam exposure on the sexually dimorphic rat locus coeruleus, *Neurotoxicol Neuroteratol* 15: 139-143.

181. Roselli Ch. E., Horton, L. E. y Resko J. A. 1985. Distribution and regulation of aromatase activity in the rat hypophalamus and limbic system., *Endocrinol* 117:2471-2477.

182. Roselli Ch. E. y Klosterman, S. A. 1998. Sexual differentiation of aromatase activity in the rat brain: effects of perinatal steroid exposure. *Endocrinol* 139(7): 3193-3201.
183. Roselli Ch. E., Klosterman, S. A. y Fasasi, T. A. 1996. Sex differences in androgen responsiveness in the rat brain: regional differences in the induction of aromatase activity. *Neuroendocrinol* 64:139-145.
184. Roselli Ch. E. y Resko J. A. 1987. The distribution and regulation of aromatase activity in the central nervous system. *Steroids* 50(4): 495-508.
185. Roselli Ch. E. y Resko J. A. 1993. Aromatase activity in the rat brain: hormonal regulation and sex differences. *J Steroid Biochem Molec Biol* 44 (4): 499-508.
186. Roselli Ch. E. y Resko J. A. 2001. Cytochrome P450 aromatase (CYP19) in the non-human primate brain: distribution, regulation and functional significance. *J Steroid Biochem Mol Biol* 79(1): 247-253.
187. Sachs, B. D. y Meisel, R. L., 1988. The physiology of male sexual behavior, En *The Physiology of Reproduction*. Knobil, E. y Neil, J., (eds) Raven Press, New York, vol 2, 1393.
188. Sánchez-Santed, F., Calés, J. M., Enríquez, P. y Guillamón, A. 1993. Early postnatal estrogen organizes sex differences in the extinction of a CRF running response. *Brain Res Bull* 30: 649-653.
189. Segovia, S. y Guillamón, A. 1988. *Psicobiología del desarrollo*. (eds) Ariel, Barcelona, España. 1ª. edición. 80-131.

190. Segovia, S. y Guillamón, A. 1997. Sexual differences in the vomeronasal system, *Brain Res Rev* 44(4):377-382.
191. Segovia, S., Pérez-Laso, C., Rodríguez-Zafra, M., Cáles, J. M., Del Abril, A., De Blas, M. R., Collado, P., Valencia, A. y Guillamón, A. 1991. Early postnatal diazepam exposure alters sex differences in the rat brain. *Brain Res Bull* 26: 899-904.
192. Simerly, R. B., Gorski, R. A. y Swanson, L.W. 1985. The distribution of monoaminergic cells and fibers in a periventricular preoptic nucleus involved in the control gonadotropine release: immunohistochemical evidence for a dopaminergic sexual dimorphism. *Brain Res* 330: 55-64.
193. Simerly, R. B., Gorski, R.A. y Swanson, L.W. 1986. Neurotransmitter specificity of cells and fibers in the medial preoptic nucleus: and immunohistochemical study in the rat, *J Comp Neurol* 246: 343-363.
194. Shimura, T., Yamamoto, T. y Shimokochi, M. 1994. The medial preoptic area is involved in both sexual arousal and performance in male rats: re-evaluation of neuron activity in freely moving animals. *Brain Res* 640: 215-222.
195. Shimura, T., Yamamoto, T. y Shimokochi, M. 1994. The medial preoptic area is involved in both sexual arousal and performance in male rats: re-evaluation of neuron activity in freely moving animals. *Brain Res* 640: 215-222.
196. Slob, A. K., Vander Werff, J. J., Bosch, T. 1977. The fundamental role of gonadal steroids in sexual behavior. *Bail Clin Psych* 3:1-24.
197. Smith, E. R., Lee, R. L., Schnur, S. L. y Davidson, J. M. 1987. Alpha2-adrenoceptor antagonists and male sexual behavior: I. Mating behavior. *Physiol Behav* 41: 7-14.

198. Steimer, T. y Hutchison, J. B. 1990. Is androgen-dependent aromatase activity sexually differentiated in the rat and dove preoptic area, *J Neurobiol* 21:787-795.
199. Stewart, J., Skvarenina, A. y Pottier, J. 1975. Effects of neonatal androgens on open field and maze learning in the prepubescent and adult rat, *Physiol Behav* 14: 291-295.
200. Sutter-Dub, M. T. 2002. Rapid non-genomic and genomic responses to progestogens, estrogens, and glucocorticoids in the endocrine pancreatic B cell, the adipocyte and other cell types. *Steroids* 67(2):77-93.
201. Swanson H. E. y Van Der Werff, J. J. 1965. The early androgen syndrome; effects of prenatal testosterone propionate, *Acta Endocrinol Copenh* 50: 379-390.
202. Tagaki, K. y Kawashima, S. 1993. Culture of rat brain preoptic area neurons: effects of sex steroids, *Int J Dev Neuros* 11: 63-70.
203. Toran-Allerand, C. D. 1980. Sex steroids and the development of the new born mouse hypothalamus and preoptic area in vitro. *Brain Res* 189: 6:413-427.
204. Toran-Allerand, C. D. 1984. On the sexual differentiation of the central nervous system morphogenetic consequences of steroidal exposure and possible role of α -protein. *Progress Brain Res* 61: 63-97.
205. Trevor, W. S. 1996. CNS Neurotransmitters and neuromodulators. Neuroactive steroids. En. Sexual dimorphism in the CNS and the role of steroids. Guillamón, A. y Segovia, S. (eds). Boca Raton, 127-152.
206. Turkenburg, J. L., Swaab, D. F., Endert., E., Louwerse, A. L., y Van de Poll, N. E. 1988. Effects of lesions of the sexually dimorphic nucleus on sexual behavior of testosterone-treated female rats, *Brain Res Bull* 21: 215-224.

207. Uhlmann, E. y Peyman, A. 1990. Antisense oligonucleotides: a new therapeutic principal, *Chem Rev* 90: 544-584.
208. Vancutsem, M. P. y Roessler, M. L. 1997. Neonatal treatment with tamoxifen causes immediate alterations of the sexually nucleus dimorphic of the preoptic area and medial preoptic area in male rats, *Teratol* 56: 220-228.
209. Van Hartesveldt, C. y Joyce, J. N. 1986. Effects of estrogen on the basal ganglia, *Neurosci Biobehav Rev* 10:1-14.
210. Vega Matuszczyk, J. y Larsson, K. 1995. Sexual orientation and feminine and masculine sexual behavior of male rats prenatally exposed to antiandrogen or antiestrogen, *Horm Behav* 29: 191-206.
211. Velázquez-Moctezuma, J., Monroy, E., Beyer, C., Canchola, E. 1984. Effects of REM deprivation on the lordosis response induced by gonadal steroids in ovariectomized rats, *Physiol Behav* 32(1): 91-4.
212. Veney, S. L., Rissman, E. F. y Freeman, L. M. 2000. Perinatal organization of a sexually dimorphic aromatase enzyme-containing immunoreactive nucleus, *Neuroreport* 11(15):3409-3412.
213. Viglietti-Panzica, C., Blathazart, J., Plumari, L., Fratesi, S., Absil, P. y Panzica, G. C. 2001. Estradiol mediates effects of testosterone on vasotocin immunoreativity in the adult quail brain, *Horm Behav* 40(4): 445-461.

214. Vinader-Caerols, C., Collado, P., Segovia, S. y Guillamón, A. 2000. Estradiol masculinizes the posteromedial cortical nucleus of the amygdala in the rat, *Brain Res Bull* 53(3):269-273.
215. Ward, I. L. 1972. Prenatal stress feminizes and demasculinizes the behavior of males. *Science* 175: 82-84.
216. Warner, R. K., Thompson, J. T., Markowski, J., Loucks, J. ., Bazzet, T. J., Eaton, R. C. y Hull, E. M. 1991. Microinjection of the dopamine antagonist cis-flupenthixol into MPOA impairs copulation, penile reflexes and sexual motivation in male rats, *Brain Res* 540:177-182.
217. Weisz, J. y Gonsalvus, P. 1973. Estrogen levels in immature female rats: true of spurious-ovarian or adrenal?, *Endocrinol* 93(1): 57-65.
218. Whalen, R. E. y Edwards, D. A. 1966. Sexual reversibility in neonatally castrated male rats. *J Comp Physiol Psychol* 62: 307-310.
219. Willier B.H, Gallagher T.F, Koch F.C. 1935. Sex modification in the chick embryo resulting from injections of male and female hormones, *Proc Natl Acad Sci U S* 21:625-631.
220. Wilson, J. D., George, F. W. y Griffin, J. E. 1981a. The hormonal control of sexual development, *Science* 211(20): 1278-1984.
221. Wilson, J. D., George, F. W. y Griffin, J. E. 1981b. Role of gonadal hormones in development of the sexual phenotypes. *Science* 211:1278-1284.

222. Wiseman, H. 1994. Tamoxifen: New membrane mediated mechanisms of action and therapeutic advances. *TIPS* 15:83-89.
223. Wolff E. y Ginglinger A. 1935a. Sur la production experimentale d'intersexués par l'injection de folliculine á l'embryon de poulet. *Acad. Sci. Paris*, 200(2):118-121.
224. Wolff E. y Ginglinger A. 1935b. Sur la transformation des poulets males intersexués par injection de folliculine d'hormone femelle aux embryons. *Arch Anat Hist Embryol* 20: 219-278.
225. Wong, R. y Judd, M. 1973. Infantile handling and successive spatial reversal learning in rats. *Behav Biol* 8: 391-398.
226. Wood, R. I. y Williams, S. J. 2001. Steroidal control of male hamster sexual behavior in ME and MPOA: effects of androgen dose and tamoxifen. *Physiol Behav* 72(5):727-733.

ANEXO

Artículo aceptado para su publicación en Pharmacological Research

Vol. 45 ó 46, 2002

Javier Velazquez Moctezuma

De: Ida Ceserani <sifcese@comm2000.it>
Para: <jvm@xanum.uam.mx>
Enviado: Viernes, 12 de Abril de 2002 08:32 a.m.
Asunto: your ms acceptance for publication in Pharmaocl Res

Dr. Javier Velazquez Moctezuma
Depto de Biología de la reproducción
univ. Autónoma Metropolitana Iztapalapa
CP 09340 Iztapalapa, DF Mexico
Milan, April 12, 2002
Fax +525 8044704

Dear Dr. Moctezuma,

your paper PHR0015050 entitled: "Monoaminergic and cholinergic stimulation of masculine sexual behavior in neonatally demasculinized male rats" Morales-Otal A, Ferreria-Nuno A, Velazquez-Moctezuma J has been accepted for publication. It will appear in the next available issue of Pharmacological Research, Vol. 45 or 46, 2002.

May I take this opportunity to invite you to submit other manuscripts on the same or on similar topics for our consideration?

Best regards.

Yours sincerely,
Dr. Ida Ceserani
Assistant to the Editor

12/04/02

**MONOAMINERGIC AND CHOLINERGIC STIMULATION OF MASCULINE
SEXUAL BEHAVIOR IN NEONATALLY DEMASCULINIZED MALE RATS.**

MORALES OTAL A., FERREIRA- NUÑO A. AND VELÁZQUEZ MOCTEZUMA J.

**Department of Reproductive Biology,
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
Mexico City, C.P., 09340, MEXICO.**

Corresponding Author:

Dr. Javier Velázquez Moctezuma
Departamento de Biología de la Reproducción,
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
C.P. 09340, Iztapalapa, D.F. México.
Phone: (525)8044704 and 6552
Fax: (525) 8044930
E-mail: jvm@xanum.uam.mx

SUMMARY

Sexual behavior during adulthood largely depends upon hormonal events that take place around birth. Administration of the antiestrogen Tamoxifen (Tx) to males immediately after birth induces a marked decrease of masculine sexual behavior during adulthood. On the other hand, it is well known that masculine sexual behavior can be stimulated by the administration of specific drugs acting on the adrenergic, cholinergic, serotonergic and dopaminergic systems. In this study, male rats were neonatally treated with Tx in order to induce demasculinization. During adulthood their masculine sexual behavior was analyzed both spontaneously and after the administration of drugs that stimulate masculine sexual behavior. Neonatal administration of Tx induced clear impairments of masculine sexual behavior during adulthood. Administration of oxotremorine (a cholinergic muscarinic agonist), 8-OH-DPAT (a

serotonergic 5-HT_{1A} receptor blocker), yohimbine (an α_2 -adrenergic blocker) and apomorphine (a dopaminergic agonist) were unable to fully restore masculine sexual behavior in demasculinized males. Only slight improvements of some behavioral parameters were observed with 8-OH-DPAT and yohimbine. Oxotremorine seems to induce a worsening of sexual behavior impairments. Results obtained with apomorphine were not significantly different from saline controls. Data suggest that neonatal treatment with Tx induces permanent impairments of the neural circuitry regulating masculine sexual behavior not only limited to morphological changes but also functional alterations of the neurotransmitter systems.

Key Words : Sexual differentiation; yohimbine ; 8-OH-DPAT, oxotremorine ; apomorphine.

INTRODUCTION

It is well known that brain sexual differentiation in rodents takes place during the early stages of life and largely depends on the hormonal environment (1). It has been reported that cerebral tissue is sensitive to hormonal influences during a critical period which extends from the last days of gestation to approximately 5 days of age (2; 3). During this period, normal brain sexual differentiation can be altered either by gonadectomy or by the exogenous administration of gonadal steroids (4). Male rats neonatally castrated display during the adulthood a decrease of masculine sexual behavior. This effect can be prevented by neonatal administration of testosterone or estradiol (5). Administration of the antiestrogen Tamoxifen (Tx) to new born male rats induces a marked loss of masculine sexual behavior during adulthood as well as an increase in feminine sexual behavior (6; 7).

On the other hand, it is now well established that masculine sexual behavior in rodents is regulated by the activity of several neurotransmitter systems (8; 9; 10; 11; 12; 13). Stimulation of masculine sexual behavior activity can be readily done by the administration of drugs that act specifically on the receptors of some neurotransmitter system. Pharmacological agents that have repeatedly demonstrated their ability to improve sexual behavior in rodents are: yohimbine, a selective blocker of the α_2 -adrenergic receptors; apomorphine, an agonist of the D₂ dopaminergic receptors; oxotremorine, an agonist of the muscarinic receptors and 8-OH-DPAT, a selective agonist of the 5-HT_{1A} serotonergic receptors (for review see: 9).

The present study was aimed to analyze whether the impairments of masculine sexual behavior during adulthood induced by neonatal treatment with Tx can be reversed by the administration of drugs that stimulate this behavior by acting on a specific neurotransmitter system. In addition, as Tx has proven it is capable of inducing demasculinization in at least two different treatment schedules (14; 15), in this experiment we used both of them to compare their potencies to induce demasculinization.

METHODS

Wistar rats from our own vivarium were used in this study. Adult females were mated and afterwards were kept in individual cages with food and water available ad lib., within a room with controlled temperature and under an inverted 12 x 12 light cycle (light off: 09:00 hrs). In the delivery day (D0), offspring were weighed and their sex was determined by the anogenital distance. Female offspring were eliminated from the study and male pups were cross-fostered, keeping the same size (n=5) in all the litters. Offspring were randomly assigned to one of the following treatments:

Group A (Tx8) (n=25).- Subjects were treated daily with subcutaneous administration of 12.5 µg of Tx dissolved in a volume of 0.05 ml of corn oil. Injections were applied from day 1 to day 8 of age.

Group B (CON8) (n=14).- Ss received a daily injection of corn oil in the same volume and in the same period as group A.

Group C (Tx5) (n=33).- Ss received a daily injection of 100 µg of Tx dissolved in 0.05 ml of corn oil. Injections were applied from day 1 to day 5 of age.

Group D (CON5) (n=15).- Ss received a daily injection of corn oil in the same volume and in the same period as group C.

All injections were done between 11 and 12 hours. After the treatment period, the animals were left undisturbed with their mothers. At 30 days of age, Ss were weaned and housed in groups (5 per cage) with the same treatment. Ss were checked daily for testicular descend since day 35 of age.

At three months of age, rats were tested for spontaneous masculine sexual behavior four times. Tests for sexual behavior were done during the dark phase of the cycle and under dim red light illumination, using a plexiglass arena (45 cm diameter) with sawdust on the floor. The male was introduced in the arena for a 5 min habituation period. Afterwards, a stimulus female was introduced in the arena. Stimulus females were brought into estrous by sequential treatment of estradiol (5 µg) followed 44 hours later by the administration of 500 mg of progesterone, 4 hours before the test. The recording session lasted for 30 minutes and the following parameters were assessed: latencies of mount (ML), intromission (IL) and ejaculation (EL); number of mounts (NM) and intromissions (NI) preceding each ejaculation; ejaculatory frequency (EF); postejaculatory refractory period (PR), the intercupsulatory (ICI) and interintromission (III) interval and the hit rate (HR).

One week after the recording their spontaneous sexual behavior, 10 Ss from each experimental group were randomly selected to constitute group E (Tx8), group F (Tx5) and control group G. Ss were weekly tested for masculine sexual behavior after the intraperitoneal (IP) administration of one of the following treatments:

A. Oxotremorine sesquifumarate (OXO) (Sigma Chemical, Co. St. Louis, MO) a muscarinic receptor agonist (0.4 mg/kg/bw dissolved in 0.3 ml of saline). Injection was done 15 minutes before the test. 30 minutes before OXO administration, rats were treated with an injection of methyl-scopolamine, a peripheral muscarinic blocker (3mg/kg/bw in 0.3 ml saline) in order to avoid peripheral effects of OXO.

B. 8 OHDPAT (8-hidroxi-2(di-n-propilaminotetraflina) (Res. Biochem. Inc) agonist of the 5-HT_{1A} serotonergic receptors. The dose administered was 0.125 mg/kg/bw dissolved in 0.3 ml of saline solution. The injection was done 15 minutes before the recording session.

C. Yohimbine (Yh) (Sigma Chemical, Co. St. Louis, MO) an α_2 -adrenergic receptor antagonist (2 mg/kg/bw dissolved in 0.3 ml of distilled water). Injection was done 20 minutes before test.

D. Apomorphine hydrochloride (APO) (Sigma Chemical, Co. St. Louis, MO). an agonist of the D₂ dopaminergic receptors (80 μ g/kg/bw in 0.3 ml of saline). Injection was done 5 minutes before the test.

E. Saline 0.3 ml, 5 minutes before the test.

The sequence of the injections was randomly assigned for each subject following a Latin square design. Treatments and tests were given during the dark phase of the light cycle.

Results were analyzed using the Kruskal-Wallis test, followed when significant by the Dunnet test. Analysis of proportions was done using the Chi square test ($n > 20$ cases) or Fisher test ($n < 20$ cases).

RESULTS

1. Effects of neonatal Tx administration:

As Figure 1 shows, both schedules of Tx administration induced a significant decrease in the percentage of subjects displaying mounts (%SsM) (panel A), intromission (%SsI) (Panel B) or ejaculation (%SsE) (Panel C) when compared to control group. There were not significant differences between both treatments. When the characteristics of the copulatory behavior of the active subjects were analyzed, a significant ($p < 0.01$ and 0.05) lengthening of mount (Fig 2A), intromission (Fig 2B) and ejaculation (Fig 2C) latencies was detected. The treatment with Tx during 8 days seems to induce a bigger effect in these parameters when compared to the 5 days treatment with 100 μ g.

The number of mounts (NM) was significantly ($p < 0.05$) increased in the animals receiving both schedules of Tx treatment (fig 3A), whereas the number of intromissions shows no differences between the control and the experimental groups (Fig 3B). The ejaculatory frequency was drastically reduced (fig 3C) in the

only subject that displayed the pattern in both experimental groups. Data on other parameters of sexual behavior are presented in table 1.

II.- Pharmacological stimulation of sexual behavior in Tx treated rats.

Figure 4 shows how the percentage of copulating animals is affected after the administration of OXO, 8OH, Yh and APO. One hundred percent of control animals (i.e., animals neonatally treated with saline) displayed mount (A), intromission (B) and ejaculatory (C) pattern after the administration of the four drugs. The administration of OXO failed to exert any stimulatory effect on the %Ss displaying mount, intromission or ejaculation. The administration of 8-OH exerted a stimulatory effect but only in the Tx8 group, inducing that hundred percent of the Ss displayed mounts and intromissions and a slight increase in the percentage of ejaculators. The Tx5 group seems to have only a slight improvements in the percentage of mounts and intromissions. Administration of Yh fully restores the %Ss displaying mounts and intromissions in both the Tx5 and the Tx8 group, however, the %Ss displaying ejaculation was not improved. Administration of APO induced only a stimulatory effect in the %Ss displaying mounts in the Tx5 group, without inducing any significant effect on the other copulatory patterns.

Results concerning mount, intromission and ejaculation latencies as well as number of mounts and intromissions are presented in Table 2. In general, almost all treatments enlarge mount and intromission latencies in Tx8 group, while Tx5 group was similarly affected only on intromission latencies. In addition, the number of mounts increase with all the treatments in both Tx5 and Tx8 group.

DISCUSSION

The present results corroborate previous findings showing that neonatal treatment with the antiestrogen Tx permanently alters the display of masculine sexual behavior during adulthood. Although the dose of Tx administered in each group seems to be quite different (100 µg/5 days vs 12.5 µg/8 days), the effect on sexual behavior showed only slight differences between them. In addition, when drugs were tested only small differences were detected between both Tx groups. The data also indicate that this alteration can not be fully restore with the administration of drugs in doses that repeatedly have proved their efficacy to stimulate masculine sexual behavior (16; 17; 11; 12; 18; 13; 19), suggesting that neonatal hormonal manipulation induces a permanent impairment of the neurotransmitter systems involved in the regulation of the expression of masculine sexual behavior.

Although in the present study only one dose of each pharmacological agent was tested, it has been reported that the dose used of yohimbine (16; 17), oxotremorine (13), 8-OH-DPAT (18) and apomorphine (19) induce a clear and significant stimulation of most of the behavioral parameters assessed during the test, when intact animals have been tested (For review see: 9).

As it has been mentioned above, previous studies have reported that neonatal administration of Tx induces morphological changes in brain structures closely related to the regulation of masculine sexual behavior, such as the hypothalamic medial preoptic area and the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area (SDN-POA) (5). Furthermore, a severe reduction of the volume and neuron numbers in the SDN-POA has been observed in male rats immediately after 5 days of Tx administration (i.e., 6-day-old males). These data support the notion arise since the pioneering work of Phoenix (20) concerning an organizational (or permanent) effect of the steroid hormones mainly located during the early development of the brain, which is transformed during adulthood in an activational (or transient) effect (20). It is clear that the normal expression of masculine sexual behavior in adulthood requires the integrity of the neural circuits involved. Furthermore, it seems that the neurotransmitter systems that are capable to stimulate masculine sexual behavior, requires also of the early organizative actions of steroid hormones to exert their effects in the adult subject.

Although the SDN-POA is not the only structure involved in the regulation of masculine sexual behavior, its importance has been repeatedly demonstrated by lesion (4; 21; 22) or stimulation (23) techniques. Thus, it is possible that, although the SDN-POA is not the only site where the drugs injected in the present study were acting, its functional integrity is a necessary condition for the expression of the hormonal or pharmacological stimulation of masculine sexual behavior.

It remains to be elucidated if an increase in the doses of yohimbine or 8-OHDPAT could reach the full reversion of masculine sexual behavior impairments neonatally induced by Tx administration. In addition, other neurotransmitter systems involved in the expression of masculine sexual behavior should be analyzed.

REFERENCES

- 1.- MacLusky NJ, Naftolin F. Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* 1981; 211: 1294-1303.
- 2.- Gorski RA Sexual differentiation of the brain: possible mechanisms and implications. *Can J Physiol Pharmacol* 1985; 63: 577-594.
- 3.- Rhees EW, Shryne JE, Gorski RA. Termination of the hormone sensitive period for differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in male and female rats. *Dev Brain Res* 1990; 52: 17-23.

- 4.- Gorski RA, Gordon JH, Shryne JE, Southam AM. Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. *Brain Res* 1978; 148: 333-346.
- 5.- Döhler KD. The pre- and postnatal influence of hormones and neurotransmitters on sexual differentiation of the mammalian hypothalamus. *Int Rev Cytol* 1991; 131: 1-57.
- 6.- Döhler KD, Coquelin A, Davis F, Hines M, Shryne JE, Sickmoller PM, Jarzab B, Gorski RA. The pre- and postnatal influence of an estrogen antagonist and an androgen antagonist on differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in male and female rats. *Neuroendocrinol* 1986; 42: 443-448.
- 7.- Csaba G, Dobozy O, Dallo J. Influence of neonatal steroid (diethylstilbestrol, allylestrenol) treatment on the sexual behaviour of the adult rat. *Med Biol* 1986;64: 193-195.
- 8.- Dohanich G, Witcher J, Weaver D, Clemens L. Alteration of muscarinic binding in specific brain areas following estrogen treatment. *Brain Res* 1982; 241: 347-350.
- 9.- Bitran D, Hull E. Pharmacological analysis of male rat sexual behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 1987; 11: 365-389.
- 10.- Mas M, Rodríguez del Castillo A, Guerra M, Davidson J, Battaner E. Neurochemical correlates of male sexual behavior. *Physiol Behav* 1987; 41: 341-345.
- 11.- Hull E, Bitran D, Pehek E, Holmes G, Warner R, Band L, Clemens L. Brain localization of cholinergic influence on male sexual behavior in rats: agonists. *Pharmacol Biochem Behav* 1988A; 31: 169-174.
- 12.- Hull E, Pehek E, Bitran D, Holmes G, Warner R, Band L, Bazzet T, Clemens L. Brain localization of cholinergic influence of male sexual behavior: antagonists. *Pharmacol Biochem Behav* 1988B; 31: 175-178.

- 13.- Retana S, Domínguez E, Velázquez-Moctezuma J. Muscarinic and nicotinic influences on masculine sexual behavior in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1993; 44: 913-917.
- 14.- Iguchi T, Ohta Y. Cellular effects of early exposure to tamoxifen. In: J. A. Kellen, ed. Tamoxifen: Beyond the Antiestrogen. Birkhauser, Boston, 1995: 179-200.
- 15.- Calés JM, Sánchez-Santed F, Pérez-Laso C, Rodríguez-Zafra M, Segovia S, Guillamón A. Effects of early postnatal sex steroids on acquisition and extinction of a continuously reinforced lever-pressing response. *Brain Res Bull* 1992; 28: 937-941.
- 16.- Clark JT, Smith ER, Davidson JM. Evidence for the modulation of sexual behavior by α -adrenoceptors in male rats. *Neuroendocrinol* 1985; 41: 36-43
- 17.- Smith ER, Lee RL, Schnur SL, Davidson JM. α 2-adrenoceptor antagonists and male sexual behavior: I. Mating behavior. *Physiol Behav* 1987; 41: 7-14
- 18.- Haensel SM, Mos J, Olivier B, Slob K. Sex behavior of male and female rats affected by the serotonin agonist 8-OH-DPAT. *Pharmacol Biochem Behav* 1991; 40: 221-228.
- 19.- Melis RM, Mauri A, Argiolas A. Apomorphine-and Oxytocin-Induced penile erection and Yawning in intact and castrated male rats: Effects of sexual steroids. *Neuroendocrinol* 1994; 59: 349-354.
- 20.- Phoenix CH, Gor RW, Gerall AA, Young WC. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinol* 1959; 65: 369-382.
- 21.- Arendash GW, Gorski RA. Effects of discrete lesions of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area or other medial preoptic regions on the sexual behavior of male rats. *Brain Res Bull* 1983; 10: 147-154.

22.- De Jonge FH, Louwerse AL, Ooms MP, Evers P, Endert E, Van de Poll NE. Lesions of the SDN-POA inhibit sexual behavior of male Wistar rats. *Brain Res Bull.* 1989; 23: 483-492.

23.- McCarthy MM, Chlenker EH, Pfaff DW. Enduring consequences of neonatal treatment with antisense oligodeoxynucleotides to estrogen receptor messenger ribonucleic acid on sexual differentiation of rat brain. *Endocrinol* 1993; 133(2): 433-438.

LEGENDS

Figure 1.- Percentage of males treated neonatally with Tx displaying mounts (A), intromissions (B) or ejaculations (C) during adulthood. Numbers on the bars express the number of active subjects in each group. Tx5: 100 µg of Tx/5 days. Tx8: 12.5 µg Tx/8 days. * = $p < 0.01$ Chi square test, compared to control group.

Figure 2.- Mount (A), intromission (B) and ejaculation (C) latencies in males treated neonatally with Tx. Numbers on the bars express the number of active subjects in each group. Tx5: 100 µg of Tx/5 days. Tx8: 12.5 µg Tx/8 days. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$ compared to control group. Kruskal-Wallis followed by the Dunnett test.

Figure 3.- Number of mounts (A), intromissions (B) in the first copulatory series and ejaculatory frequency (C) of males treated neonatally with Tx. Numbers on the bars express the number of active subjects in each group. Tx5: 100 µg of Tx 5 days Tx8: 12.5 µg Tx/8 days. * = $p < 0.01$ compared to control. Kruskal-Wallis followed by the Dunnett test.

Figure 4.- Percentage of males treated neonatally with Tx (N=10) displaying mounts (A), intromissions (B) and ejaculations (C) after the administration of oxotremorine (OXO), 8 hydroxy-di (2n-propilaminotetraline) (8OH), yohimbine (YH) and apomorphine (APO). * = $p < 0.02$; ** = $p < 0.05$ compared to their respective saline control. Fisher test.

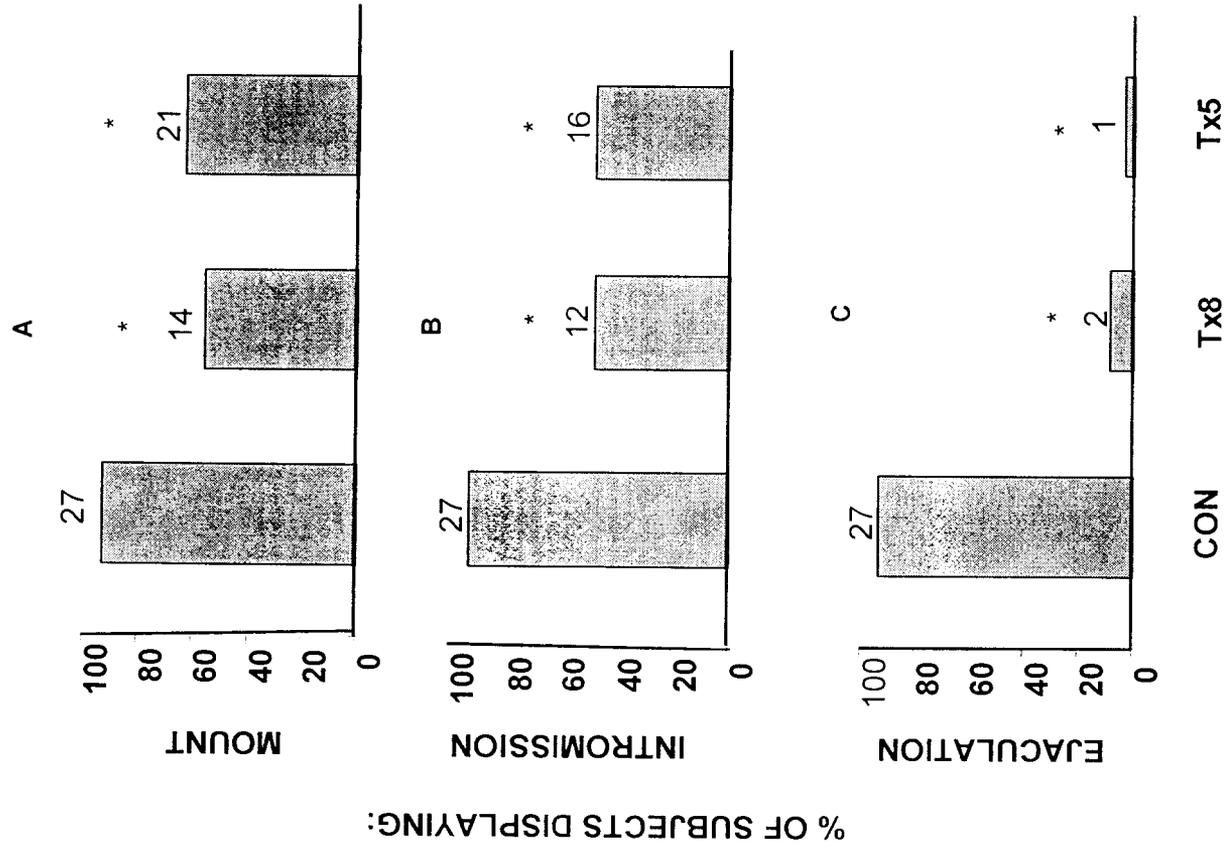


Figure 1. Morales-Otal y et al.

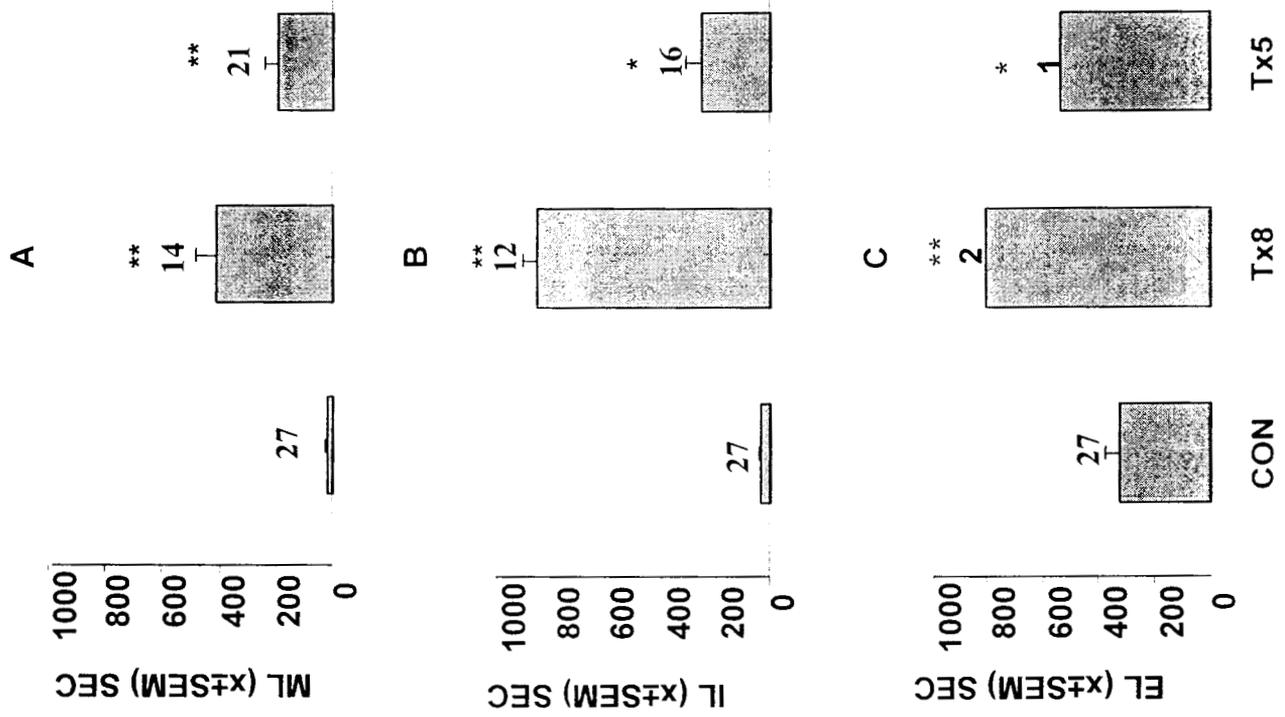


Figure 2. Morales-Otal y et al.

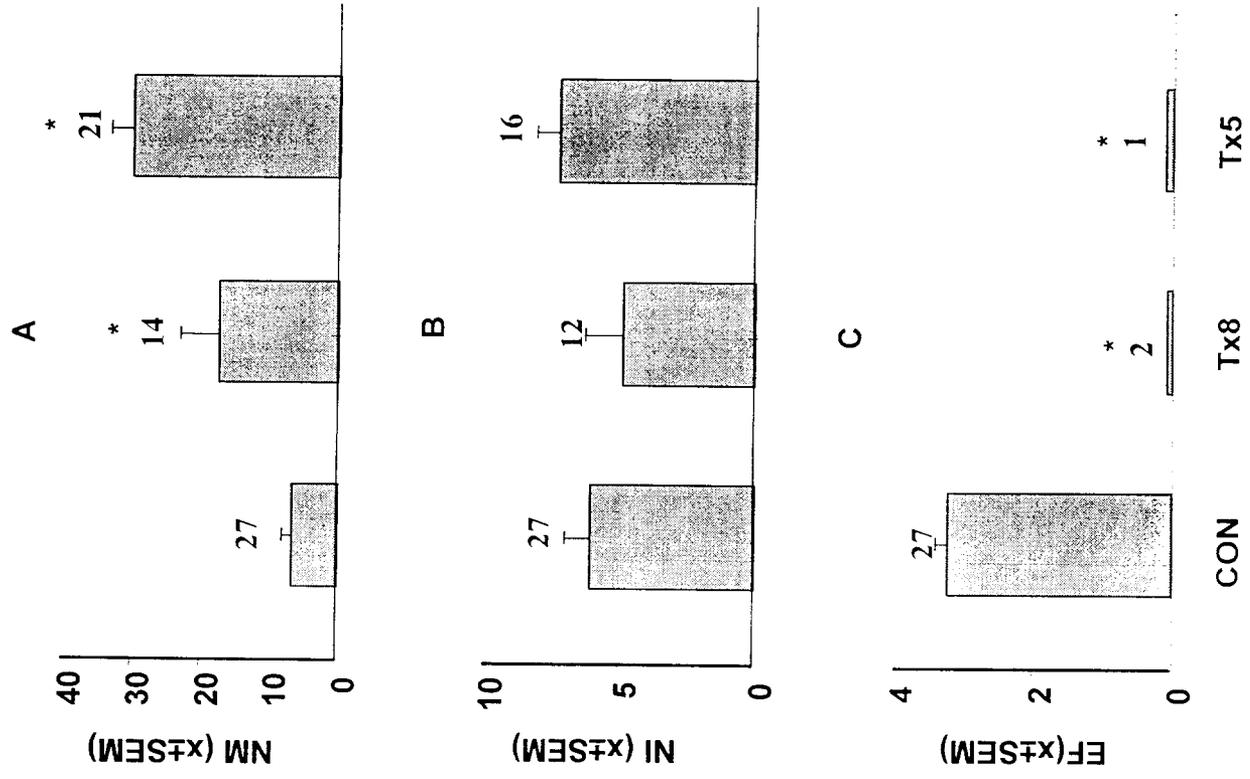


Figure 3. Morales-Otal y et al.

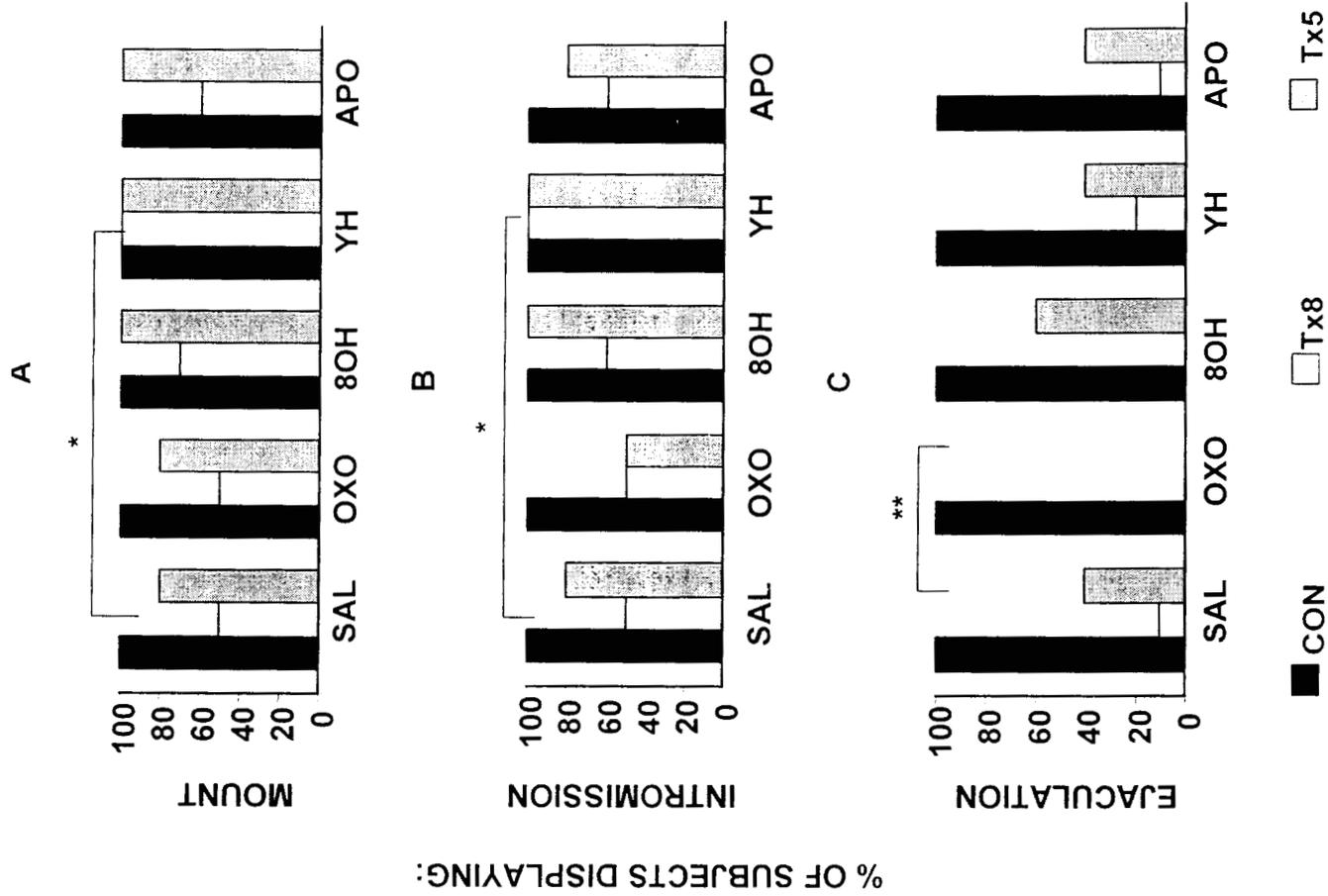


Figure 4. Morales-Otal y et al.

Table 1. Effects of monoaminergic and cholinergic agents on masculine sexual behavior of rats neonatally treated with tamoxifen.

Mount Latency (ML)					
Treatment	Saline	OXO	8-OH-DPAT	YH	APO
CON	16 ± 5.38	32.4 ± 6.5**	31.3 ± 4.6**	18.7 ± 3.5	18.4 ± 2
Tx8	420.5 ± 61.7	350.8 ± 178.6	240.6 ± 89	391.7 ± 119	457 ± 141
Tx5	238 ± 63.1	34 ± 7.1**	53.1 ± 12**	51.8 ± 14.7**	72 ± 18.7**
Intromission Latency (IL)					
Treatment	Saline	OXO	8-OH-DPAT	YH	APO
CON	24 ± 6.1	39.3 ± 10.4	34.4 ± 3.7	21.7 ± 4.5	25 ± 4.5
Tx8	674.5 ± 143	282.6 ± 190	327.5 ± 100	473 ± 113	342 ± 173
Tx5	232 ± 78.3	902 ± 369	263.7 ± 76.8	172 ± 57	119.6 ± 53
Ejaculation Latency (EL)					
Treatment	Saline	OXO	8-OH-DPAT	YH	APO
CON	255 ± 25	178 ± 35.8*	117 ± 22**	175.4 ± 32**	172.4 ± 22**
Tx8	964	NR	NR	302.5 ± 239.5*	375
Tx5	615 ± 165.2	NR	288.1 ± 92.7	358.5 ± 127	247.2 ± 37.9
Number of Mounts (NM)					
Treatment	Saline	OXO	8-OH-DPAT	YH	APO
CON	5.8 ± 0.78	3.55 ± 0.58*	3.36 ± 0.6*	3.27 ± 0.41**	3.9 ± 0.75*
Tx8	20 ± 5	22.8 ± 6.1	31.5 ± 10.1	10.7 ± 2.2	16.2 ± 6.3
Tx5	28.4 ± 2.4	9.6 ± 3.2**	4.5 ± 0.9**	6.4 ± 1.8**	15.4 ± 3.5**
Number of Intromissions (NI)					
Treatment	Saline	OXO	8-OH-DPAT	YH	APO
CON	8.3 ± 0.64	5 ± 1**	5 ± 0.39**	5.5 ± 0.53**	4.23 ± 0.37**
Tx8	8.4 ± 2.4	5.6 ± 1.5	8.6 ± 2.2	5.2 ± 1.2	6 ± 1.6
Tx5	7.2 ± 1.3	4.2 ± 1.39	4.8 ± 0.64	6.54 ± 0.77	12.8 ± 5.37
Ejaculatory Frequency (EF)					
Treatment	Saline	OXO	8-OH-DPAT	YH	APO
CON	2.5 ± 0.23	3 ± 0.1	3.6 ± 0.39**	3 ± 0.19	3.8 ± 0.32**
Tx8	1	NR	NR	2 ± 1	2
Tx5	2 ± 0.4	NR	2.66 ± 0.3	2.25 ± 0.25	3.75 ± 0.25

Table 1. Data are expressed as mean \pm S.E.M. Kruskal-Wallis followed by the Dunnett test. *p <0.05;

**p<0.01 compared with their respective saline control. NR=no data available.

ACKNOWLEDGEMENTS: The authors want to express their gratitude to Miss Edith Monroy for her expert advice on manuscript language.