

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

UNIDAD SUR

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

"Interacción de posibles factores causales y áreas cerebrales involucradas en la
preferencia sexual en la rata macho"

Tesis que presenta

Alejandra Hernández González

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

En la especialidad de

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Director de la Tesis: Dr. José Alonso Fernández Guasti

Ciudad de México

Mayo 2021

Esta tesis fue desarrollada en el laboratorio No. 16 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Sur. Bajo la dirección del Dr. José Alonso Fernández Guasti.

Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. De becario 338459)

Agradecimientos

Al Dr. Alonso Fernández Guasti, por su invaluable apoyo, su orientación y su gran contribución a mi formación profesional, por las discusiones académicas generadas y por compartir su conocimiento.

A mis sinodales: Dra Gabriela Rodríguez Manzo, Dra. Claudia González Espinosa, Dr. Francisco Sotres Bayón y Dr. Raúl Paredes Guerrero, por todos sus comentarios, sugerencias y observaciones que sin duda contribuyeron al presente trabajo.

A la M. en C. Rebeca Reyes Serrano y a la C. Blanca Nelly Gómez Quintanar por su apoyo técnico y por las discusiones académicas generadas.

A mi familia por su apoyo incondicional. A Rosario por siempre estar a mi lado.

A Jorge y a todos mis amigos por ser un soporte.

INDICE

Resumen.....	v
Abstract.....	vi
CAPÍTULO 1	
1.1 Introducción.....	1
1.2 Conducta sexual y proceso de diferenciación sexual.....	2
1.2.1 <i>Sexualidad humana.....</i>	2
1.2.2 <i>Conducta sexual de la rata.....</i>	4
1.2.3 <i>Diferenciación sexual.....</i>	7
CAPÍTULO 2	
2.1 Hipótesis organizacional/activacional de las hormonas esteroides.....	9
CAPÍTULO 3	
3.1 Preferencia sexual y orientación sexual.....	14
3.1.1 <i>Homosexualidad.....</i>	14
3.1.2 <i>Modelos animales de homosexualidad.....</i>	15
CAPÍTULO 4	
4.1 Posibles factores que determinan la preferencia sexual.....	18
4.1.1 <i>Componente endócrino de la preferencia sexual.....</i>	18
4.1.2 <i>Orden de nacimiento y orientación sexual.....</i>	22
4.1.3 <i>Inmunidad, desarrollo cerebral y orientación sexual.....</i>	24
4.1.4 <i>Estrés materno y preferencia sexual.....</i>	25
CAPÍTULO 5	
5.1 Áreas cerebrales y preferencia sexual.....	28
5.2 Medición de la expresión de c-Fos como marcador de la actividad neuronal ...	41
CAPÍTULO 6.	
6.1 Justificación.....	43
6.2 Hipótesis generales.....	44
6.2.1 <i>Hipótesis específicas.....</i>	44

6.3 Objetivo general	45
6.3.1 <i>Objetivos específicos</i>	45
CAPÍTULO 7.	
7 Metodología	46
7.1 Metodología general	46
7.1.1 <i>Animales</i>	46
7.1.2 <i>Administración prenatal de letrozol</i>	46
7.1.3 <i>Prueba de preferencia sexual</i>	47
7.1.4 <i>Pruebas de conducta sexual</i>	48
7.1.4.1 <i>En la prueba de preferencia</i>	48
7.1.4.2 <i>En el redondel. Conducta sexual con la hembra receptiva y el macho experto</i>	48
7.2 Metodología particular	49
7.2.1 <i>Posibles factores que determinan la preferencia sexual</i>	
7.2.1.1 <i>Gestaciones consecutivas y administración prenatal de letrozol: efecto sobre la preferencia sexual de la progenie masculina</i>	49
7.2.1.2 <i>Interacción entre el estrés de la madre y la administración prenatal de letrozol en la preferencia sexual de ratas macho en la etapa adulta</i>	51
7.2.2 <i>Áreas cerebrales y preferencia sexual</i>	
7.2.2.1 <i>Determinación de la actividad cerebral mediante la cuantificación de c-Fos</i>	52
7.3 Análisis estadístico	57
CAPÍTULO 8.	
8 Resultados	59
8.1 Posibles factores que determinan la preferencia sexual	
8.1.1 <i>Gestaciones consecutivas y administración prenatal de letrozol: efecto sobre la preferencia sexual de la progenie masculina</i>	59
8.1.1.1 <i>Composición de la camada</i>	59
8.1.1.2 <i>Preferencia sexual</i>	60

8.1.1.3	<i>Conducta sexual en la prueba de preferencia</i>	64
8.1.1.4	<i>Pruebas de conducta sexual</i>	65
8.1.1.4.1	<i>Conducta sexual con la hembra receptiva</i>	65
8.1.1.4.2	<i>Conducta sexual con el macho sexualmente experto</i>	65
8.1.1.5	<i>Evaluación de la interacción: tratamiento prenatal de letrozol y multiparidad</i>	67
8.1.2	<i>Interacción entre el estrés de la madre y la administración prenatal de letrozol en la preferencia sexual de ratas macho en la etapa adulta</i>	68
8.1.2.1	<i>Preferencia sexual</i>	68
8.1.2.2	<i>Conducta sexual en la prueba de preferencia</i>	71
8.1.2.3	<i>Pruebas de conducta sexual</i>	71
8.1.2.3.1	<i>Conducta sexual con la hembra receptiva</i>	71
8.1.2.3.2	<i>Conducta sexual con el macho sexualmente experto</i>	72
8.2 Áreas cerebrales y preferencia sexual		
8.2.1	<i>Determinación de la actividad cerebral mediante la cuantificación de c-Fos</i>	74
8.2.1.1	<i>Inmunoreactividad a c-Fos ante la exposición al estímulo</i>	76
CAPÍTULO 9.		
9 Discusión		82
9.1 Posibles factores que determinan la preferencia sexual		
9.1.1	<i>Gestaciones consecutivas y administración prenatal de letrozol: efecto sobre la preferencia sexual de la progenie masculina</i>	82
9.1.1.1	<i>Preferencia sexual</i>	82
9.1.1.2	<i>Conducta sexual</i>	85
9.1.2	<i>Interacción entre el estrés de la madre y la administración prenatal de letrozol en la preferencia sexual de ratas macho en la etapa adulta</i>	87
9.1.2.1	<i>Preferencia sexual</i>	87
9.1.2.2	<i>Conducta sexual</i>	88

9.1.2.3 Ausencia de interacción entre la administración de letrozol y estrés prenatal con la preferencia sexual.....	89
9.1.3 Multiparidad, estrés y letrozol.....	93
9.2 Áreas cerebrales y preferencia sexual	
9.2.1 Determinación de la actividad cerebral mediante la cuantificación de c-Fos.....	94
9.3 Conclusiones.....	106
9.4 Perspectivas.....	108
CAPÍTULO 10.	
Referencias.....	109
Anexo.....	130
Trabajos derivados de esta tesis.....	130

Resumen

La preferencia sexual de los mamíferos se presenta usualmente de manera diferencial: los machos prefieren hembras en estro mientras que éstas prefieren interactuar sexualmente con un macho experto; sin embargo, en todas las especies estudiadas existe una subpoblación que prefiere tener interacciones sexuales con individuos de su mismo sexo. Los factores que determinan esta preferencia no se han descrito completamente, aunque se sabe que la inhibición perinatal de la aromatasa (enzima que convierte andrógenos en estrógenos) cambia la preferencia de los machos cuando adultos. Sin embargo, estos cambios ocurren sólo en una proporción de los sujetos (aproximadamente 30 a 40%), indicando que otros factores pudieran estar involucrados y que la preferencia sexual sea el resultado de la interacción entre ellos.

En la primera parte de este trabajo estudiamos el efecto de la multiparidad o el estrés -y su posible interacción con el componente endócrino- en la determinación de la preferencia sexual. Se evaluó la preferencia sexual de la progenie masculina de ratas múltiparas (4 a 6 gestaciones previas) y se encontró un incremento en el porcentaje de machos con preferencia sexual por otros machos (39%) comparado con aquél que se presenta de manera espontánea en machos nacidos de hembras primíparas jóvenes o envejecidas (4%). En machos con preferencia por sujetos de su mismo sexo se vieron disminuidas las conductas de intromisión y de eyaculación, y se expresaron las conductas de lordosis y de proceptividad. Desafortunadamente no fue posible evaluar la interacción de la multiparidad y el componente endocrino, debido a que las hembras múltiparas tratadas con el inhibidor de aromatasa, letrozol (0.56µg/kg, G10-G21), no lograron procrear.

Al evaluar la preferencia sexual de machos nacidos de hembras estresadas durante la gestación (G10-G21) se encontró un incremento en el porcentaje de machos con preferencia por sujetos de su mismo sexo (31%), mayor al observado en el grupo control (5%). La combinación de estrés prenatal y letrozol (0.56µg/kg, G10-G21) aumentó el porcentaje a un (50%). En los animales estresados y con preferencia por el macho disminuyó la conducta sexual masculina (intromisión y eyaculación), y se incrementó la conducta de lordosis.

En la segunda parte del trabajo, se determinó la actividad cerebral, medida por la expresión de la proteína c-Fos, ante la presencia de un macho sexualmente experto en animales control, tratados prenatalmente con letrozol y preferencia por la hembra o por el macho. Se encontró que en los animales con preferencia por el macho hubo un incremento en la inmunoreactividad a c-Fos en el área preóptica media, la corteza anterior del cíngulo y el núcleo accumbens. Estos datos sugieren que estas estructuras forman parte de un circuito de activación cerebral asociado con la preferencia sexual.

Abstract

Mammalian partner preference is usually sexually different: males prefer to interact with estrous females, while these females prefer to interact with sexually expert males. However, in all studied species there is a subpopulation of males that prefer to interact with a same sex partner. The possible factors underlying this sex preference have not been completely described, although it is known that the perinatal aromatase inhibition (enzyme that converts androgens into estrogens) changes the sex preference of the males when adults. However, this change occurs only in a proportion of subjects (30 to 40%) indicating that possibly other factors may be involved, and that the establishment of sexual preference may be the result of their interaction.

In the first part of this work we studied the effect of multiparity or stress - and their putative interaction with the endocrine component - in the determination of sexual preference. We evaluated the partner preference of the male progeny born of multiparous females (4 to 6 previous gestations) and we found an increase to 39% of males with same-sex preference (versus 4% observed in the progeny of the control group or of primiparous aged group). Males with male preference had a reduced intromission and ejaculation behaviors, and showed lordosis and proceptivity. Unfortunately, it was impossible to evaluate the interaction between multiparity and the endocrine factor, because the multiparous dams did not deliver after treatment with the aromatase inhibitor, letrozol (0.56 μ g/kg, G10-G21).

When the sexual preference of males born from stressed dams (G10-G21) was evaluated, we found an increase in the percentage of males with same-sex preference (31%) compared to that observed in controls (with no treatment, 5%). The combined treatment (stress plus letrozole, 0.56 μ g/kg, G10-G21) increased this percentage to 50%. Males with same-sex preference had reduced intromission and ejaculation behaviors and an increased lordosis behavior.

In the second part of this work we determine the brain activity -evaluated by the expression of c-Fos protein- in control males, males prenatally treated with letrozole with female or male preference after exposed to a sexually experienced male. The animals with male preference had an increased c-Fos immunoreactivity in the medial preoptic area, the anterior cingulate cortex and the nucleus accumbens. These data suggest that these structures form part of a brain circuit associated with sexual preference.

CAPÍTULO I

1.1 Introducción

La presente tesis tiene dos secciones claramente divididas, pero naturalmente relacionadas. Los primeros capítulos titulados: Conducta sexual y procesos de diferenciación sexual, Hipótesis organizacional/activacional de las hormonas esteroides y Preferencia sexual y orientación sexual son comunes a todo el trabajo. En la siguiente sección se estudió la posible interacción entre diferentes factores causales de la preferencia sexual. La idea de que los factores podrían interactuar para promover el desarrollo de la preferencia sexual por otros machos proviene de dos líneas de evidencia, la primera basada en la observación de que ninguna manipulación experimental produce que todos los sujetos macho presenten preferencia por sujetos de su mismo sexo, es decir, todas las manipulaciones realizadas hasta ahora sólo provocan que parte de la progenie masculina, cuando adulta, tenga preferencia por el macho. La segunda evidencia, proviene de observaciones en humanos que han sugerido que existen varias causales involucradas en la homosexualidad entre las que ahora se cuentan factores genéticos, hormonales, estrés materno, orden de nacimientos y posiblemente exposición a fármacos durante el embarazo. De hecho, Bocklandt y colaboradores en 2006 sugirieron que la población de sujetos homosexuales puede estar formada de varios subgrupos con orígenes biológicos específicos y diferentes.

En la segunda sección de la presente tesis se analiza la posible activación diferencial de algunas áreas cerebrales en sujetos con preferencia por otros de su mismo sexo cuando son expuestos a un estímulo. Se eligieron varias áreas

cerebrales que se han involucrado en el control de la preferencia sexual como el área preóptica media, el núcleo acumbens, el núcleo ventromedial del hipotálamo y la amígdala, y otras, fundamentalmente corticales que participan en procesos de elección en otros paradigmas conductuales. Esta sección, al igual que la anterior, encuentra algunos antecedentes en humanos que han establecido que existe diferente activación cerebral entre sujetos homosexuales y heterosexuales dependientes del estímulo y otros en experimentos básicos en animales de laboratorio.

1.2 Conducta sexual y proceso de diferenciación sexual

1.2.1 Sexualidad humana

La conducta sexual es una de las conductas más importantes en los mamíferos puesto que, además de sus fines reproductivos, involucra un componente hedónico. Debido a que es importante que se mantengan aquellas conductas necesarias para la preservación de la especie, el factor reforzante de la conducta sexual tiene implicaciones evolutivas que aseguran que la conducta se repita (Ford & Beach, 1951; Daly & Wilson, 1999; Meston & Buss, 2007).

La historia de la sexualidad humana es tan larga como la historia de la humanidad misma, puesto que el ser humano ha hablado de sexo desde su existencia; sin embargo, el estudio científico de la sexualidad se ha realizado únicamente en los últimos 125 años aproximadamente. El primero en abordar el estudio sistemático de la sexualidad humana fue Ellis en 1897. Mediante estudios de caso pretendía visibilizar y normalizar las expresiones sexuales. Posteriormente los estudios de Sigmund Freud, en los inicios del siglo XX, colocan a la sexualidad como eje

fundamental del ser humano. Fue hasta la mitad del siglo XX cuando comenzaron los estudios sistemáticos de la sexualidad por parte de Alfred Kinsey. Estos estudios se basaron en cuestionarios para adquirir datos acerca de las prácticas sexuales de los individuos. Una de las mayores aportaciones de Kinsey fue la escala para medir la conducta sexual, que toma en cuenta la atracción sexual, fantasías sexuales, prácticas sexuales y autopercepción (Kinsey et al., 2003; Lucas & Fox, 2018).

La sexualidad humana es compleja y puede ser estudiada desde diversos puntos de vista; sin embargo, más allá del componente reproductivo, la sexualidad humana conlleva una gran variedad de expresiones conductuales. La organización mundial de la salud (OMS) define la sexualidad humana como: “un aspecto central del ser humano a lo largo de su vida que incluye el sexo, las identidades o roles de género, el erotismo, el placer, la intimidad, la reproducción y la orientación sexual. La sexualidad se expresa a través de pensamientos, deseos, fantasías, creencias, roles, actitudes y relaciones interpersonales. Puede incluir todas esas dimensiones, no obstante, no todas se vivencian o se expresan siempre. La sexualidad es influenciada por la interacción de factores biológicos, psicológicos, sociales, económicos, políticos, culturales, legales, históricos, religiosos y espirituales” (WHO 2006). Dada la definición misma de la sexualidad, la forma de estudiarla puede ser a través de diferentes aproximaciones y a su vez es el resultado de la interacción de múltiples factores.

Jacques Balthazart define la sexualidad humana como un fenómeno complejo y multidimensional que incluye varios aspectos de la conducta y la personalidad. Se pueden distinguir cuatro dimensiones que la forman, pero que no son

completamente independientes: 1) Los patrones conductuales expresados en los individuos y las motivaciones que los subyacen, 2) la orientación sexual definida como hacia quién están orientadas las conductas o fantasías sexuales, 3) la identidad sexual de los individuos y 4) el rol de género que los individuos tienen en la sociedad (Balthazart, 2012).

1.2.2 Conducta sexual de la rata

En la rata, la conducta sexual es sexualmente dimórfica, lo que quiere decir que existen patrones de comportamiento sexual específicos para cada sexo. La conducta sexual en roedores se ha descrito ampliamente en condiciones controladas de laboratorio, debido a que la cópula en ambientes naturales tiene ligeras variaciones, como la cópula en grupos (Robitaille & Bovet, 1976). Sin embargo, los patrones conductuales observados en ambos casos son similares (Heijkoop et al., 2018).

La conducta sexual tiene una clara función biológica, es decir, la reproducción; sin embargo, está en duda la conciencia reproductiva de los animales, por lo que se ha propuesto que, cuando un animal copula, el fin del acto no es la reproducción, sino que la conducta se realiza por sus características reforzantes (Agmo, 1999). La conducta sexual de los roedores puede dividirse en dos componentes; apetitivo (fase precopulatoria) y consumatorio (fase copulatoria y ejecutiva), el primero comprende todas las conductas que reflejen un interés por iniciar la cópula, evidenciados por el acercamiento al estímulo y olfateo genital, mientras que el segundo es la ejecución de los patrones conductuales que conllevan a la ejecución de la cópula (Heijkoop et al., 2018). El componente apetitivo de la conducta sexual

implica la búsqueda del encuentro copulatorio y se denomina motivación sexual (Agmo, 1999). La motivación sexual se inicia cuando aparece un potencial compañero sexual, ya que el estímulo activa la conducta de búsqueda y aproximación, por lo que la motivación sexual puede considerarse como parte de las “acciones orientadas a metas” (Agmo, 1999). La motivación sexual es una interacción entre un estado motivacional interno y estímulos incentivos externos. Existen paradigmas conductuales que ayudan a evaluar la motivación sexual, como la prueba de la pista, la prueba de motivación sexual incentiva, el paradigma de búsqueda de niveles, la prueba de preferencia de pareja o el paradigma de palanqueo (Heijkoop et al., 2018).

Una vez frente al estímulo, durante la fase copulatoria, los roedores presentan conductas estereotipadas y sexualmente dimórficas. Los machos presentan tres conductas: monta, intromisión y eyaculación. La primera es el abordaje directo sobre la parte trasera de la hembra con ligeros movimientos pélvicos, la segunda implica -además de este patrón conductual- la inserción penenana que provoca una desmonta rápida y, finalmente la eyaculación incluye -además de lo anterior- un movimiento pélvico intenso y sostenido que puede o no ir acompañado de emisión del líquido seminal (Hull & Rodríguez-Manzo, 2009; Heijkoop et al., 2018). Estas conductas se manifiestan durante una secuencia denominada serie eyaculatoria, donde aparecen de manera alternada, hasta culminar con la eyaculación (Figura 1, fase ejecutoria; Heijkoop et al., 2018). El componente reforzante de la eyaculación hace que estos patrones copulatorios se repitan de manera más eficiente con cada encuentro sexual (Hull & Rodríguez-Manzo, 2009). Por su parte, la conducta sexual femenina se presenta cuando los niveles de hormonas sexuales (estradiol y

progesterona) son elevados, y consiste en las conductas de proceptividad o precopulatorias (orejeo, brincoteo y zigzageo) y la conducta de lordosis, el componente consumatorio de esta conducta, que es la dorsiflexión del cuerpo de la hembra y la elevación de la grupa para permitir la inserción del pene (Erskine, 1989; Heijkoop et al., 2018).

En roedores, la expresión de la conducta sexual es dependiente de las concentraciones de hormonas gonadales (testosterona en el caso de los machos y estrógenos y progesterona en las hembras). Esto ha sido demostrado dado que animales castrados pierden el interés y la capacidad de copular, es decir, la falta de hormonas afecta componentes apetitivos y consumatorios (Bell, 2018; Hull & Domínguez, 2007).

Además, la expresión de estas conductas depende de los niveles hormonales que ocurren durante el desarrollo.

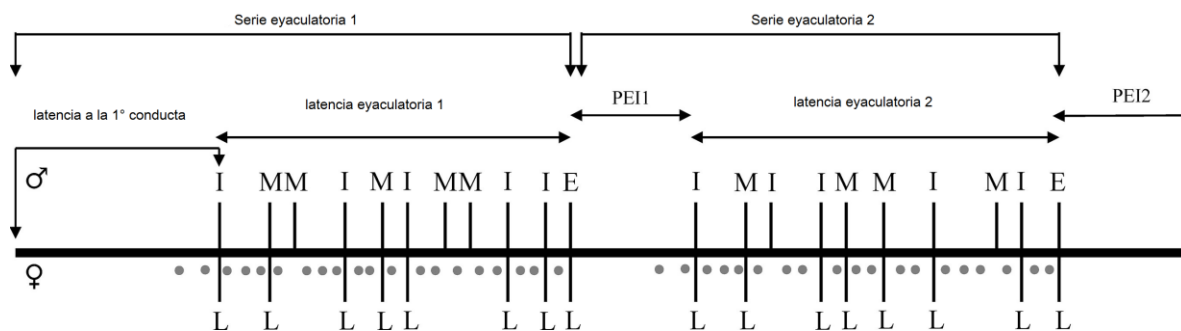


Figura 1. Patrones conductuales durante la copula de la rata macho. Se muestran 2 series eyaculatorias y las conductas que se presentan durante ese tiempo tanto en machos como en hembras, M = monta, I = intromisión, E = eyaculación, L = lordosis, • = conductas proceptivas, PEI = Intervalo poseyaculatorio. Tomado y modificado de Heijkoop et al., 2018.

1.2.3 Diferenciación sexual

En todos los mamíferos existen diferencias morfológicas, funcionales y conductuales entre ambos sexos; estas últimas provienen de un proceso de diferenciación cerebral que ocurre perinatalmente (Baum, 2003; Wu et al., 2009; Juntti et al., 2008; Xu et al., 2012). La diferenciación sexual ocurre en diferentes etapas; la primera es la determinación del sexo genético, que depende del cromosoma sexual que porte el espermatozoide. En los mamíferos, los individuos pueden contener dos cromosomas X o un cromosoma X y uno Y. Dentro del cromosoma Y, se encuentra el gen SRY, necesario para el desarrollo de los testículos en el feto. Sin el gen SRY, la gónada deriva hacia ovario. De esta manera, se da inicio a una serie de procesos que culminan con el desarrollo del sexo gonadal y la formación del sexo fenotípico (Figura 2). Sin embargo, la determinación del sexo no solamente ocurre a nivel cromosómico y genital. En el macho, el proceso de determinación del sexo cerebral es orquestado por las hormonas sexuales producidas por el testículo fetal que actúan en el cerebro (Bakker et al., 1996a).

Las diferencias entre las acciones que tienen las hormonas en el cerebro adulto ya formado y aquéllas que ejercen sobre el cerebro en desarrollo llevó a sugerir la hipótesis organizacional activacional de las hormonas esteroides.

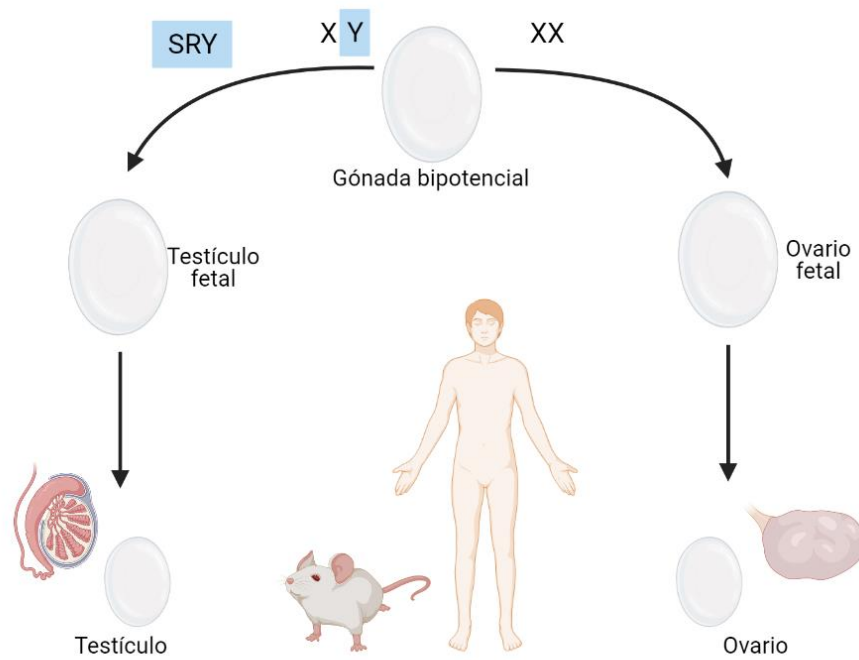


Figura 2. Proceso de determinación sexual gonadal. La gónada primitiva masculina expresa el gen SRY (contenido en el cromosoma Y) y éste, a su vez, activa los mecanismos para diferenciar el testículo, contrario a lo que ocurre en la hembra, donde se desarrolla el ovario. Creado en Biorender.

CAPÍTULO 2

2.1 Hipótesis organizacional/activacional de las hormonas esteroides

La hipótesis del efecto organizacional activacional de las hormonas esteroides tiene sus orígenes en el trabajo publicado por Phoenix y colaboradores en 1959, en el cual se demostró que existen cambios durante la etapa de desarrollo perinatal que son capaces de determinar características específicas para cada sexo, los cuales se centran en las diferencias conductuales que se expresan cuando adultos. Este efecto es uno de los principios más aceptados de la neuroendocrinología conductual y modula el proceso de diferenciación sexual cerebral. Este proceso, es mediado por esteroides gonadales, se relaciona con aspectos conductuales y diferencias sexuales y se presenta aunado a la determinación sexual, derivada de la carga cromosómica del individuo (McCarthy, 2008). La primera fase de modelamiento sexual se denominó etapa organizacional, debido al papel que tienen las hormonas sexuales en el arreglo de estructuras cerebrales. Las gónadas fetales de ambos sexos tienen actividad sintética de esteroides desde etapas muy tempranas del desarrollo. Así, el testículo fetal de la rata (y de muchas otras especies de mamíferos incluido el humano) es capaz de producir testosterona (Arnold, 1996). Durante el periodo organizacional del cerebro se modelan estructuras cerebrales que posteriormente serán sexualmente dimórficas, como el núcleo sexual dimórfico del hipotálamo anterior (SDN) o el núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH), ambas estructuras relacionadas con la expresión de la conducta sexual (De Jonge et al., 1989; Hull & Rodríguez-Manzo, 2009). Se ha descrito que, en roedores, el proceso por el cual se modelan estas estructuras cerebrales es a

través de la aromatización de testosterona a estrógenos en el cerebro, mediante la acción de la aromatasa (Lephart, 1996). En el cerebro masculino de varias especies de roedores, la testosterona aromatizada y convertida a estradiol, modula los cambios morfológicos y puntuales en el cerebro. En hembras, contrario a lo que ocurre en machos, la glicoproteína plasmática alfa-fetoproteína, que tiene una alta afinidad por estrógenos (pero no por andrógenos), previene la masculinización del cerebro femenino (Bakker et al., 2006). La hormona responsable del proceso de diferenciación sexual cerebral en machos de varias especies es el estradiol; los efectos de esta hormona durante el desarrollo son muy específicos ya que produce cambios puntuales morfológicos y funcionales que son la base de las diferencias sexuales conductuales. Así, algunas estructuras cerebrales de las ratas macho recién nacidas tienen dos o tres veces más estradiol que las de las hembras, la gran mayoría de ese estradiol proviene de la aromatización de testosterona gonadal, pero se ha demostrado que incluso existe síntesis de estradiol *de novo* en el cerebro masculino (Fester et al., 2011; Schlinger et al., 2001). Las acciones organizacionales de las hormonas sexuales se dan sólo en periodos muy específicos del desarrollo, es decir, la exposición del cerebro a estas hormonas antes o después de esos periodos carece de efecto. Esto ha llevado a proponer que la ventana de acción de las hormonas esteroides gonadales durante el desarrollo es muy específica en primates (mitad y última fase de la gestación) y en roedores (en la etapa perinatal). Uno de los mecanismos propuestos para que el estradiol induzca diferencias sexuales morfológicas en algunas zonas del cerebro de los roedores es mediante la promoción de la arborización dendrítica (McCarthy, 2008). En el cerebro en desarrollo, el estradiol aumenta en un 200 a 300% la cantidad de

espinas dendríticas en comparación con los adultos (30%) y la temporalidad de los efectos también es distinta, en neonatos los cambios persisten hasta la etapa adulta y en adultos el efecto es transitorio y depende de las concentraciones de estradiol (McCarthy, 2008). Una de las estructuras más importantes en el estudio de las diferencias sexuales es el área preóptica media del hipotálamo (MPOA), que es esencial para el despliegue de la conducta sexual masculina en roedores (Hull & Domínguez, 2007). En esta estructura, los machos tienen una mayor densidad de sinapsis comparados con las hembras, en esta estructura el estradiol induce un incremento en la ciclooxigenasa 2 (COX-2) que es esencial para la producción de prostaglandinas y prostanoides, esto a su vez, aumenta la producción de prostaglandina E2 (PGE2) por sobre otros prostanoides que es liberado por la neurona y actúa sobre astrocitos vecinos, en donde produce dos efectos principales: aumento en la estelación y liberación de glutamato. El glutamato liberado, a su vez, activa sus receptores del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA), induciendo la formación de sinapsis (McCarthy, 2008; McCarthy & Arnold, 2011).

Para que se expresen las conductas sexualmente dimórficas, es necesario que en los machos ocurran de manera independiente, pero paralela, los siguientes procesos: (1) masculinización, que se refiere al proceso durante el desarrollo que induce el fenotipo masculino, mediado por estradiol que da como resultado que los machos, cuando adultos, expresen preferencia por la hembra y conducta sexual masculina. (2) Desfeminización, que se refiere a la supresión de la capacidad para expresar conducta sexual femenina y que ocurre junto con la masculinización (McCarthy, 2008; Henley et al., 2011). La feminización se define como el proceso

que ocurre en ausencia de la masculinización/desfeminización a falta de estrógenos cerebrales durante el desarrollo. Como resultado de este proceso se generará un cerebro predispuesto a desplegar la conducta sexual femenina (Figura 3; McCarthy, 2008; McCarthy & Arnold, 2011).

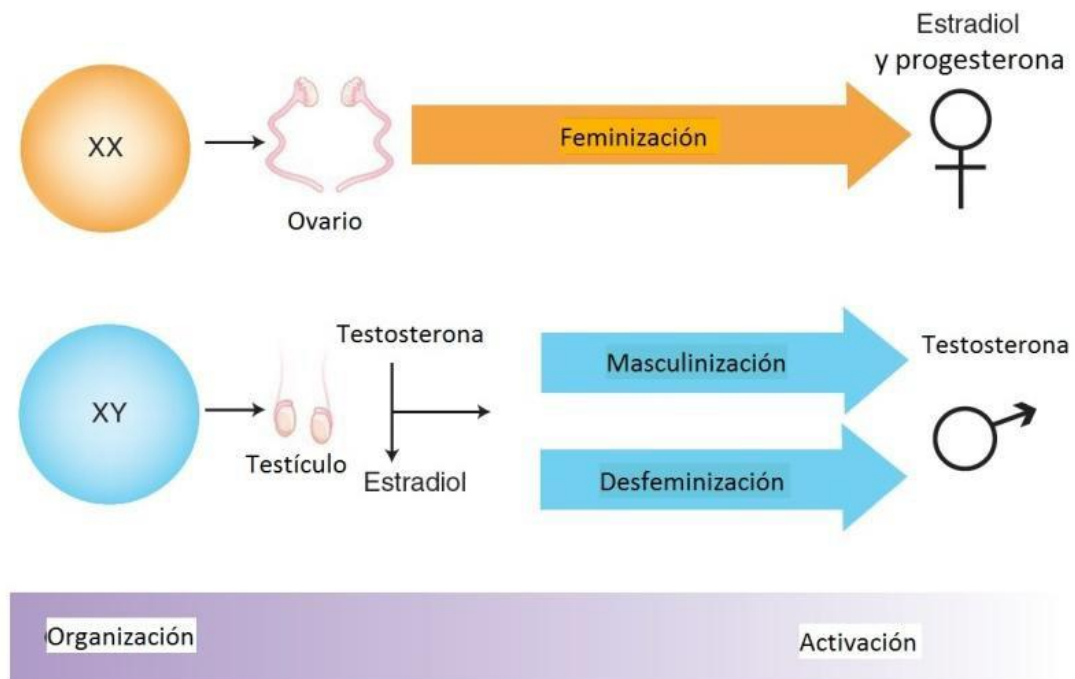


Figura 3. Proceso de diferenciación sexual mediado por hormonas esteroides sexuales. Tomado y modificado de McCarthy y Arnold, 2011.

En la adolescencia los niveles hormonales se encuentran nuevamente altos por la reactivación del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (Peper et al., 2010; Meethal & Atwood, 2005). La mayoría de las acciones de las hormonas en este periodo ocurren sobre estructuras cerebrales previamente moldeadas que se activan frente al incremento de hormonas esteroides sexuales, por lo que a esta acción se le denomina efecto activacional. Actualmente, se ha propuesto que durante la pubertad no sólo ocurre el proceso de activación mediado por las hormonas

sexuales, sino que también se presenta una última etapa de organización, es decir, las estructuras sexualmente dimórficas pueden modificarse no sólo en la etapa perinatal sino también durante la pubertad. En los machos, se ha propuesto que estos cambios pueden estar mediados por los andrógenos, pero también por la aromatización de éstos a estradiol (Figura 4., Kellogg & Lundin, 1999; Berenbaum & Beltz, 2011; Ahmed et al., 2008; Juraska et al., 2013).

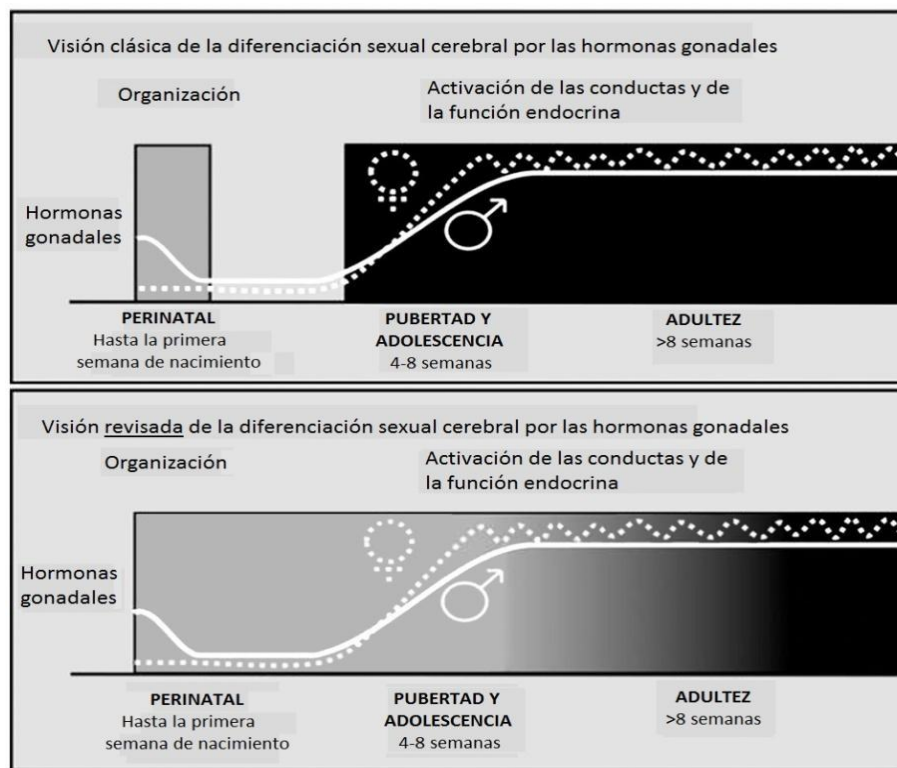


Figura 4. Hipótesis organizacional-activacional revisada, que incluye el periodo organizacional que ocurre durante la pubertad. En gris, se muestran las acciones organizacionales y en gris oscuro-negro, las activacionales. Tomado y modificado de Juraska y cols., 2013.

CAPÍTULO 3

3.1 Preferencia sexual y orientación sexual

3.1.1 Homosexualidad

Como ya se mencionó, en los humanos, la sexualidad puede dividirse en cuatro dimensiones que comprenden: los patrones de acción específicos de ejecución de la conducta y la motivación para realizarla. La orientación sexual, que indica el sexo hacia el que el individuo dirige su conducta, sus deseos y las fantasías. La identidad sexual hace referencia al sexo con el que el individuo se identifica y el rol del género se refiere al papel que el individuo juega en la sociedad (Baltazarth, 2012).

Siguiendo la definición anterior, un individuo homosexual es aquel que tiene deseo, motivación y fantasías sexuales con sujetos de su mismo sexo. La proporción de individuos que presenta esta orientación es aproximadamente del 4.5 al 5.4% de la población masculina. Interesantemente, puede variar la visibilidad (entendida como la aceptación y en función de ello, la percepción social de la misma) de la expresión homosexual entre culturas, debido a que ciertas sociedades son mucho más permisivas, en contraposición con sociedades más conservadoras. Además, este porcentaje se repite en diferentes especies (Sommer & Vasey, 2006). Sin embargo, independientemente de la permisividad que tenga, el porcentaje de sujetos homosexuales se mantiene; es decir, la homosexualidad es constante en prácticamente todas las culturas, sugiriendo que, aparte del componente social y cultural, puede existir un componente biológico (Baltazarth, 2012). El estudio sistemático de la homosexualidad comenzó desde el siglo XIX, tras los estudios de Karl Heinrich Ulrichs, quien propuso que la homosexualidad es un componente innato de la sexualidad humana, argumentando que se trata de una mente

(masculina o femenina) que no corresponde con el cuerpo (hombre o mujer; Kennedy, 1997). La preferencia sexual de los sujetos puede evaluarse mediante la escala de Kinsey (1949), donde el 0 corresponde al indicador de una conducta enteramente heterosexual 1 a una conducta principalmente heterosexual, 2 predominantemente heterosexual, 3 bisexual, 4 predominantemente homosexual, 5 principalmente homosexual y el 6 es el indicador de una conducta completamente homosexual (Kinsey et al., 2003).

3.1.2 Modelos animales de homosexualidad

Uno de los modelos animales ampliamente utilizados para el estudio biológico de conductas humanas es el de los roedores. Si bien en ellos no podemos establecer conceptos como el de homosexualidad (que es un término antropocéntrico imposible de trasladar a animales), sí es posible medir la preferencia sexual; es decir, con qué potencial compañero sexual prefiere interactuar un sujeto cuando tiene la oportunidad de elegir. A pesar de la controversia y limitaciones (Wallen & Parsons, 1997; Vasey, 2002) existe una serie de criterios para establecer que un modelo animal refleja específicamente la preferencia sexual (Vasey, 2002). Los criterios para determinar la preferencia sexual en los modelos animales incluyen: 1) que el sujeto debe tener la opción de elegir simultáneamente entre un macho y una hembra, 2) los animales estímulo deben encontrarse sexualmente activos o motivados, 3) las interacciones deben culminar con la consumación de la conducta sexual, 4) el sujeto no debe ser forzado a elegir alguno de los estímulos y 5) debe demostrarse que las conductas usadas para medir la preferencia sexual, deben ser sexuales, al menos en parte (Vasey, 2002).

La mayoría de las ratas macho invierten más tiempo cerca de hembras sexualmente receptivas, mientras que las hembras en estro prefieren la compañía de los machos (Bakker et al., 1996a; Piffer et al., 2009; Olvera-Hernández et al., 2015). Sin embargo, existe una subpoblación de machos que de manera natural prefiere pasar más tiempo cerca de individuos de su mismo sexo y eventualmente tener interacciones sexuales con ellos (Vasey, 2002; Roselli & Stormshack, 2009; García-Cárdenas et al., 2015). De manera experimental, existen varios paradigmas conductuales para evaluar la preferencia sexual de los roedores (Figura 5) que pueden clasificarse en dos: los que permiten la interacción con el estímulo (Bakker et al., 1996a; Olvera-Hernández et al., 2015) y aquellos que únicamente permiten el acercamiento a través de señales olfativas o visuales, pero sin interacción (Dela Cruz & Pereira, 2012; Liu et al., 2011) los cuales ofrecen distintas ventajas y desventajas de acuerdo a las características del modelo que se apegan en mayor o menor medida a los criterios definidos anteriormente. En el caso de los modelos que evitan la interacción, se pueden evaluar más claramente los componentes apetitivos de la preferencia sexual sin que interfieran los elementos de interacción sexual o social. Por otro lado, la interacción física también representa una ventaja para evaluar tanto los componentes apetitivos como consumatorios de la preferencia sexual (Agmo, 1999; Cherry & Baum, 2020).

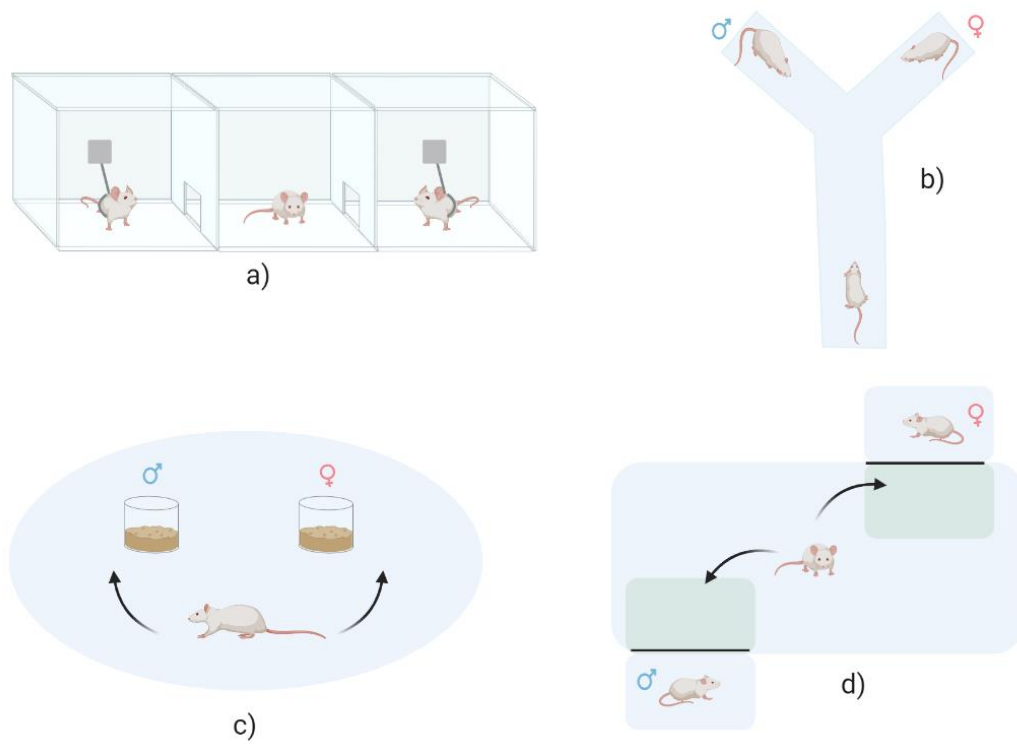


Figura 5. Modelos animales para evaluar la preferencia sexual a) caja de tres compartimentos, b) laberinto en Y, c) aserrín de animales estímulo sexualmente activos y d) caja de motivación sexual incentiva. Ver texto para detalles. Creado en Biorender.

CAPÍTULO 4

4.1 Posibles factores que determinan la preferencia sexual

El estudio de los factores biológicos que subyacen a la expresión de la homosexualidad humana presenta complicaciones. La mayoría de las aproximaciones se realiza mediante estudios que buscan una relación entre la existencia de diversos factores (algunos en etapas tempranas del desarrollo) con la presencia de la homosexualidad (Blanchard, 2001; Bostwick et al., 2010). Adicionalmente, las discusiones sobre las causas que subyacen a la homosexualidad a menudo se basan en diferencias naturales o ideologías religiosas que vulneran a estos grupos (Acharya et al., 2017), por lo que es necesario educar a la población y establecer que la homosexualidad es una expresión de la sexualidad humana que forma parte del diverso repertorio conductual de la especie.

4.1.1 Componente endócrino de la preferencia sexual

Debido al papel central que tienen las hormonas esteroides para el desarrollo de la conducta sexual, algunas aproximaciones experimentales intentan elucidar el componente biológico de la preferencia sexual manipulando los niveles de las hormonas esteroides sexuales durante el periodo de diferenciación. Experimentos en los que se manipularon los niveles de estrógenos y andrógenos prenatales concluyeron que los estrógenos son necesarios para el desarrollo de conductas típicamente masculinas y para el proceso de desfeminización (Matuszczyk & Larsson, 1995; Matuszczyk et al., 1988). Una vez determinada la importancia de los estrógenos en la determinación de conductas sexualmente dimórficas, como la

conducta sexual, se usó el 1,4,6-androstadien-3,17-diona (ATD), un inhibidor esteroideo de la aromatasa, enzima que cataliza la conversión de andrógenos a estrógenos, para conocer si modificaciones en el ambiente hormonal durante el proceso de diferenciación, podrían influir en conductas sexualmente dimórficas, como la preferencia sexual. Este inhibidor fue administrado durante la etapa perinatal, a partir del día 11 de gestación y después del nacimiento se les colocó a las crías un implante que lo liberó gradualmente durante 10 ó 21 días. Se encontró que los machos, cuando adultos, disminuyen su preferencia por una hembra sexualmente receptiva e incrementan su preferencia por un macho sexualmente experto, medida en la prueba de tres compartimentos (Bakker et al., 1996a).

A pesar de que la administración perinatal de ATD resultó efectiva para modificar la preferencia sexual de una proporción de los sujetos (aproximadamente el 85%; Brand et al., 1991), este compuesto tiene como inconveniente que es esteroideo y posee afinidad por los receptores a estrógenos y a progesterona (Kaplan & McGinnis, 1989; Jahagirdar et al., 2008), por lo que los cambios en la preferencia sexual pueden atribuirse tanto a su acción en la aromatización como en la modulación de los receptores mencionados. En este sentido, se han buscado compuestos con una estructura no esteroidea que sean capaces de actuar con mayor selectividad sobre la aromatasa (Buzdar, 2002).

Con base en lo anterior, en nuestro laboratorio (Olvera-Hernández et al., 2015; García-Cárdenas, et al., 2015) se planteó un protocolo para inducir preferencia sexual por sujetos del mismo sexo basado en la administración de letrozol, un

inhibidor de aromatasa no esteroideo de tercera generación, que bloquea la acción de este complejo enzimático y que carece de efectos directos sobre los receptores a esteroides (Bhatnagar et al., 1990; Bian et al., 2014). La administración diaria, a partir del día 10 de la gestación, de una dosis de 0.56 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de letrozol, fue suficiente para inducir preferencia sexual por sujetos del mismo sexo en una parte de la población masculina (Olvera-Hernández & Fernández-Guasti, 2015; Hernández & Fernández-Guasti, 2018; García-Cárdenas et al., 2015). Utilizando una prueba de preferencia de tres compartimentos, en la que se coloca a un macho sexualmente experto y a una hembra sexualmente receptiva y se evalúa el tiempo que el sujeto permanece con cada uno de los estímulos para determinar la preferencia sexual (Figura 6), la proporción de sujetos con preferencia hacia animales de su mismo sexo tratados prenatalmente con letrozol fue de 30-40%. (Olvera-Hernández & Fernández Guasti, 2015; Hernández & Fernández-Guasti, 2018; García-Cárdenas et al., 2015). Esta preferencia sexual, tras la administración prenatal de letrozol, no se debe a alteraciones en los niveles de testosterona, estradiol y gonadotrofinas en la etapa adulta, ya que éstos son similares entre los animales independientemente de su preferencia sexual. Al evaluar la conducta sexual, se encontró que los sujetos con preferencia por individuos de su mismo sexo tienen la capacidad de presentar los patrones conductuales tanto de la conducta sexual masculina (montas, intromisiones y eyaculaciones) como la femenina (conducta de lordosis). Al evaluar las erecciones sin contacto, una respuesta masculina de excitación sexual que se produce frente a un estímulo sexual (Sachs, 1994), se encontró que los machos que prefieren a sujetos de su mismo sexo tienen un incremento en el número de erecciones peneanas en

presencia de un macho sexualmente experto (Hernández & Fernández-Guasti, 2018; Olvera-Hernández et al., 2015; García-Cárdenas, et al., 2015).



Figura. 6. Evaluación de la preferencia sexual en una caja de tres compartimentos. En los compartimentos laterales, se coloca a los estímulos (macho sexualmente experto izquierda y hembra sexualmente receptiva derecha) y en el compartimento central al sujeto experimental. La preferencia sexual se determina mediante el tiempo de interacción con cada uno de los estímulos, para detalles ver texto.

En humanos hay poca evidencia de la participación de hormonas en el establecimiento de la homosexualidad masculina, posiblemente porque la disminución en los niveles de aromatasa en áreas específicas del feto es difícil de registrar y más aún de asociar con una conducta que se presentará muchos años más tarde. Sin embargo, en mujeres sí se ha demostrado que aquellas que fueron expuestas a niveles inusualmente altos de andrógenos, por sufrir una patología como hiperplasia adrenal congénita, mostraban mayores índices de homosexualidad que la población general (Meyer-Bahlburg et al. 2008; Meyer-Bahlburg, 1984).

El hecho de que la administración de letrozol (manipulación que disminuye los niveles de estrógenos producidos por la aromatización) únicamente modifique la

preferencia sexual en una proporción de sujetos, invita a pensar que el componente hormonal no es el único que participa en la determinación de la preferencia sexual.

Además de la hipótesis endócrina se han propuesto otras para explicar las causas de la homosexualidad, algunas se han centrado sólo en observaciones en humanos, mientras que otras han tenido algún apoyo experimental. En las siguientes páginas se revisarán dos de estas hipótesis: el orden de nacimientos a la que subyace una idea de activación del sistema inmune materno y la hipótesis de estrés materno.

4.1.2 Orden de nacimiento y orientación sexual

Existe evidencia que sugiere que respuestas inmunes de la madre podrían participar en la determinación de la homosexualidad masculina; la hipótesis parte de estudios de correlación que han mostrado que el orden de nacimiento de los hijos está relacionado con la presencia de homosexualidad en varones. Se encontró que en los varones homosexuales es mayor la probabilidad de que tengan hermanos varones mayores. Estos resultados se han replicado de manera consistente en diferentes culturas (Blanchard, 2001; Bogaert & Skorska, 2011), lo que ha dado pie a proponer la hipótesis de la inmunidad materna, que plantea que después de un embarazo de un feto del sexo masculino, la madre puede desarrollar reacciones inmunológicas hacia otros fetos de ese sexo (Figura 7). En este caso, la madre produciría anticuerpos que pasarían la barrera placentaria y que podrían afectar al siguiente feto en desarrollo (Blanchard, 2001; Blanchard & Klassen, 1997; Bogaert & Skorska, 2011).



Figura 7. Hipótesis de la inmunidad materna. Tomado de Puts, Jordan y Breedlove, 2006.

La hipótesis de la inmunidad materna señala que la respuesta inmunológica de la madre hacia algunos componentes del cromosoma Y, puede prevenir la masculinización de los fetos, afectando tanto el desarrollo de algunas características físicas (talla) como la orientación sexual (Bogaert & Skorska, 2011). Se desconoce qué componentes específicos del cromosoma Y podrían estar implicados en el establecimiento de la preferencia sexual; entre los posibles genes involucrados, se ha propuesto al gen PCDH11Y, que codifica para la protocaderina 11, una proteína involucrada en la adhesión celular y en la formación de sinapsis y vías neurales, que se expresa predominantemente en cerebro, por lo que la presencia de un anticuerpo desarrollado por la madre, podría modificar el desarrollo de estructuras cerebrales sexualmente dimórficas (Bogaert & Skorska, 2011; Blanco et al., 2000). Del mismo modo, un trabajo publicado recientemente muestra que las mujeres con hijos homosexuales con más hermanos mayores tienen más anticuerpos contra la neuroligina 4 (NLGN4Y), otra proteína codificada por un gen localizado en el cromosoma Y (Bogaert et al., 2018).

De manera experimental no se ha estudiado si en camadas sucesivas se incrementa el número de sujetos que espontáneamente prefieren a sujetos de su mismo sexo. Existe sólo un trabajo en roedores que podría proporcionar evidencia indirecta a esta hipótesis inmune. Singh y Verma en 1987, inmunizaron a ratones hembra con células de bazo masculinas con el fin de crear una respuesta inmune hacia el antígeno H-Y y se les permitió copular hasta quedar preñadas. Cuando las crías de estas hembras llegaron a la edad adulta, los investigadores encontraron una disminución del 90% de la capacidad reproductiva de los machos (definida como la presencia de cópula; Singh & Verma, 1987).

4.1.3 Inmunidad, desarrollo cerebral y orientación sexual

A pesar de que existe un contacto físico entre la madre y el feto, la barrera placentaria mantiene separados ambos sistemas inmunes evitando que se inicie una respuesta inmunológica por parte de la madre hacia el feto (Poole & Claman, 2004). Durante el desarrollo fetal, la protección del feto ante infecciones está dada por varios factores actuando de manera conjunta (Palmeira et al., 2012). El transporte transplacentario de la placenta al feto es extremadamente importante para la protección del recién nacido, por lo que la inmunidad es transferida pasivamente de la madre al feto (Saji et al., 1999). Una gran variedad de sustancias se transfiere por la placenta, generalmente, las moléculas con pesos moleculares altos no suelen atravesar esta barrera; salvo algunas excepciones, como las inmunoglobulinas G (IgG; Saji et al., 1999). La transferencia de inmunoglobulinas maternas al feto es un mecanismo adaptativo que minimiza la deficiente producción de anticuerpos y confiere una inmunidad pasiva a corto plazo (Palmeira et al.,

2012). Se ha descrito que algunas moléculas inmunológicas son importantes para el proceso de diferenciación sexual, tal es el caso de las prostaglandinas que posiblemente están involucradas en el desarrollo de conductas sexualmente dimórficas, como la preferencia sexual, apoyando la hipótesis inmune propuesta anteriormente.

Previamente se ha determinado que la liberación de la molécula proinflamatoria, prostaglandina E2 (PGE2) es inducida por el estradiol y es necesaria para la masculinización del MPOA (Amateau & McCarthy, 2004). Además, se sabe que, durante el desarrollo cerebral de machos, las células gliales tienen una morfología distinta a las de las hembras, que concuerda con una mayor activación de las mismas, por lo que la actividad glial elevada, se relaciona con una mayor producción de PGE2 (Lenz et al., 2013; VanRyzin et al., 2016). En este sentido Lenz y colaboradores en 2018; encontraron en roedores una interesante relación entre la secreción de células cebadas durante la gestación y la expresión de la conducta sexual cuando adultos. Cuando se inhibe la desgranulación de las células cebadas, se ven alteradas la masculinización del área preóptica, la morfología de la microglía y la conducta sexual (disminución del número de eyaculaciones) en animales macho adultos, indicando la importancia de las moléculas secretadas por las células del sistema inmune (y, probablemente, de la inflamación), en la diferenciación sexual cerebral (Lenz et al., 2018).

4.1.4 Estrés materno y preferencia sexual

Otra de las hipótesis acuñadas para explicar la causa de la conducta homosexual es el estrés materno durante la gestación. Esta hipótesis sostiene que si la madre

es sometida a periodos de estrés crónico durante la gestación se producirán niveles elevados de corticosteroides, lo que impactará en el desarrollo del feto. En humanos, se ha encontrado una relación entre la orientación sexual de los hijos y las condiciones de estrés a las que las madres estuvieron sometidas (Dörner et al., 1983; Ellis & Cole-Harding, 2001; Ellis et al., 1988), aunque también existen reportes que indican que no existe relación entre estos factores (Bailey et al., 1991), es decir, la evidencia es controversial.

En condiciones experimentales, el protocolo de estrés por inmovilización provoca estrés durante la gestación. Este protocolo consiste en limitar el movimiento del roedor en un restrictor durante 30 minutos todos los días a partir del día gestacional 10 (Weller et al., 1988; Smith et al., 2004; Meek et al., 2006). La inducción de un estado de estrés en la madre aumenta su producción de hormona adrenocorticotrófica (ACTH) y de glucocorticoides que tienen efectos en el desarrollo cerebral, la neurogénesis y la densidad de astrocitos de la progenie y en su conducta cuando adultos (Weinstock, 2001; McCormick et al., 2005; Szuran et al., 2000).

Se ha encontrado que el estrés materno interfiere con la masculinización de la conducta sexual (Ward, 1972). Además, el tratamiento prenatal con betametasona, un corticosteroide sintético con propiedades antiinflamatorias, disminuye la preferencia de los machos por la hembra e incrementa en un 50% la conducta sexual femenina en la progenie masculina durante la etapa adulta (Piffer et al., 2009). Además, la administración de dexametasona y corticosterona produce una disminución de la distancia anogenital en ratas macho, lo que sugiere una disminución en los niveles prenatales a andrógenos (Dean & Sharpe, 2013; Holson

et al., 1995). Meek y colaboradores en 2006, evaluaron la preferencia sexual de ratones macho cuyas madres fueron sometidas a un protocolo de estrés durante la gestación. Encontraron en estos machos un incremento en la preferencia por el macho sexualmente experto y una disminución en la preferencia por la hembra sexualmente receptiva, demostrando que el estrés de la madre durante la gestación afecta la preferencia sexual de la progenie (Meek et al., 2006).

CAPÍTULO 5

5.1 Áreas Cerebrales y preferencia sexual

En esta segunda sección revisaremos las áreas cerebrales relacionadas con la preferencia/orientación sexual (cabe recordar que en general el término preferencia sexual se usa para estudios en animales de laboratorio, mientras que el de orientación sexual es fundamentalmente antropocéntrico). De manera natural, independientemente de las causas que producen una preferencia sexual por sujetos de su mismo sexo, la base de esta conducta, como la de cualquier otra, debe de encontrarse en el sistema nervioso central. La gran mayoría de estudios hacen una relación morfológica, y unos pocos funcional, entre algunas estructuras cerebrales y la preferencia sexual. Por otro lado, vale la pena aclarar que a la fecha se desconocen las bases anatómicas en donde reside la preferencia sexual (posiblemente no se trate de una sola estructura); sin embargo, como veremos más adelante, muchas áreas propuestas están relacionadas con la regulación de la conducta sexual.

Los primeros estudios enfocados a analizar posibles diferencias anatómicas entre los cerebros de varones homosexuales y heterosexuales demostraron diferencias en el núcleo supraquiasmático, el volumen de ese núcleo es mayor en individuos homosexuales comparado con el de heterosexuales (Swaab & Hofman, 1990). Posteriormente, LeVay en 1991 y Gorski en 1992, encontraron un mayor tamaño en el tercer núcleo intersticial del hipotálamo anterior (INAH3), así como en la comisura anterior del hipotálamo en varones homosexuales comparado con heterosexuales (LeVay, 1991; Allen & Gorski, 1992). Estos estudios, fundamentalmente descriptivos, no permitían hacer manipulaciones experimentales, por lo que desde esa perspectiva se han hecho estudios en roedores, tomando en cuenta sus ventajas y limitaciones.

Numerosos estudios han demostrado que las señales olfativas contribuyen a la selección de pareja sexual en pruebas de preferencia en muchas especies (Domínguez-Salazar et al., 2002). En roedores la gran mayoría de las señales olfativas socialmente relevantes son detectadas y procesadas por el sistema olfativo accesorio (AOS). Los olores no volátiles socialmente relevantes son detectados por receptores en neuronas del órgano vomeronasal cuyos axones proyectan al glomérulo del bulbo olfatorio accesorio (AOB; Scalia & Winans, 1975). Las células mitrales de este bulbo proyectan a núcleos amigdalinos como la amígdala medial anterior dorsal (MeAD) y la amígdala medial postero dorsal (MePD), y las neuronas de la MeAD proyectan, a través de la vía amígdalofugal, al núcleo ventromedial del hipotálamo y al área preóptica lateral, mientras que las neuronas de la MePD, a través de la estría terminal mandan axones de proyección al MPOA (Wood, 1997). En ratas, el AOS es sexualmente dimórfico, los machos tienen más neuronas en varias de las regiones cerebrales mencionadas anteriormente (Segovia & Guillamon, 1993). El MPOA es probablemente el sitio cerebral más importante en el control neural del comportamiento sexual masculino en muchas especies de vertebrados (Hart & Leedy, 1983; Hull & Dominguez, 2015). Esta evidencia se deriva de una serie de estudios utilizando diferentes técnicas que incluyen lesiones, estimulación eléctrica, registro unitario, implantes hormonales, manipulación farmacológica, así como estudios de inmunohistoquímica a c-Fos (Paredes & Baum, 1997). Esta área está involucrada en los componentes apetitivos de la conducta sexual masculina, ya que después de su lesión bilateral, los machos dejan de copular y muestran una reducción significativa de la conducta de persecución de la hembra (Lloyd & Dixon, 1988; Paredes, 2003).

La integridad del MPOA también es importante para mantener la preferencia sexual de los machos por las hembras (Paredes et al., 1998; Edwards & Einhorn, 1986). En 1998, Paredes y colaboradores mostraron que en la prueba de preferencia de tres compartimentos, las ratas macho mostraron una clara preferencia por la hembra sexualmente receptiva antes de la lesión electrolítica del MPOA. Sin embargo, después de la lesión bilateral los sujetos cambiaron su preferencia pasando más tiempo en el compartimiento del macho sexualmente activo que en el compartimiento que alojaba a la hembra receptiva (Paredes et al., 1998). Estos resultados son similares a los encontrados en hurones en los que la lesión bilateral en el MPOA provocó que los machos cambiaran su preferencia sexual (Paredes & Baum, 1995; Kindon et al., 1996).

Lo anterior pone a esta estructura como un elemento fundamental del circuito cerebral asociado a la preferencia sexual. En ratas, se encontró que la lesión excitotóxica del MPOA no parece estar involucrada con los componentes apetitivos de la conducta sexual (Hughes & Everit, 1990); sin embargo, el volumen de esta estructura es menor en animales tratados con ATD perinatal y que presentan disminuída su preferencia por la hembra (ver arriba) y su conducta sexual masculina (Houtsmuller et al., 1994). La lesión del MPOA además de producir cambios en la preferencia sexual, provoca una inhibición del comportamiento sexual masculino y una facilitación del comportamiento sexual femenino (proceptividad y receptividad) en ratas macho intactas y castradas (Hennessey et al., 1986; van de Poll et al., 1979; Olster, 1993), así como en otras especies (Hart y Leedy, 1983; Rodriguez-Sierra & Teresawa, 1979). Estos resultados son similares a los observados en ratas prenatalmente tratadas con letrozol que muestran conductas receptivas, proceptivas y preferencia

por otros machos sexualmente activos (ver arriba y Olvera-Hernández et al., 2015), lo que invita a sugerir que la organización del MPOA para que el sujeto muestre preferencia por la hembra se establece antes del nacimiento por efecto de estrógenos derivados de la aromatización y que su lesión, en sujetos adultos, produce que los animales muestren conductas típicamente femeninas.

Existen otras líneas de evidencia, además de la lesión, que apoyan el papel del MPOA en el control neural de la preferencia sexual. Por ejemplo, los carneros macho que prefieren montar a otros machos en lugar de a las ovejas receptivas mostraron una actividad de aromatasa significativamente menor en el MPOA que los carneros orientados hacia las hembras (Resko et al., 1996). Evidencias en humanos han mostrado resultados controversiales que señalan que el INAH3 del MPOA es de menor tamaño en individuos homosexuales que en heterosexuales (Le Vay, 1991). Sin embargo, otros investigadores (Swaab & Hofman, 1990) no han replicado estos resultados, posiblemente porque la definición anatómica de los INAH en humanos no es tan clara como en animales de laboratorio. En ratas también se han mostrado resultados controversiales; por ejemplo, existe evidencia de que el SDN del MPOA es menor en machos que tienen preferencia por otros machos inducida por la administración del inhibidor de aromatasa, ATD (Houtsmuller et al., 1994). Experimentos de nuestro laboratorio, sin embargo, no mostraron cambios en el tamaño del SDN del MPOA en animales con preferencia por sujetos de su mismo sexo prenatalmente tratados con letrozol (Olvera-Hernández et al., 2017).

Además, existe una serie de evidencias, usando la proteína c-Fos como marcador de actividad neuronal que indican que esta estructura cerebral se activa en machos que tienen preferencia por hembras sólo cuando tienen actividad copulatoria

(Phillips-Farfán & Fernández-Guasti, 2007; Coolen et al., 1996, 1997), de hecho se activa más conforme aumenta la actividad sexual (la activación es máxima después de la eyaculación) y no se activa si los animales son sólo expuestos a las hembras receptivas y no se permite la interacción sexual (Coolen et al., 1996, 1997; Yamaguchi et al., 2018; Baum & Everitt, 1992). Sin embargo, en 1996 Bakker y colaboradores, demostraron que en machos tratados perinatalmente con ATD, que tenían preferencia sexual por otros machos, había una activación de MPOA, medida por la expresión de c-Fos, cuando los animales se expusieron al aserrín de machos sexualmente activos. Esta activación sólo ocurrió en el MPOA y en el núcleo de la base de la estría terminal, fue diferente entre los animales tratados con el inhibidor de aromatasa y los animales control y fue similar a aquella que ocurrió en hembras sexualmente receptivas que también mostraron preferencia olfativa por estímulos provenientes del macho.

Cómo ya mencionamos, en los roedores, se ha propuesto que la información olfativa es crucial para identificar al sujeto y activar circuitos involucrados en la motivación sexual que determinarán la preferencia (Coolen, et al., 1996; 1997; Paredes, 2003; Robertson et al., 1991; Hurtazo and Paredes, 2005; Bakker et al 1996b; Baum & Everitt, 1992). El MPOA es una parte esencial de ese circuito neuronal que incluye la amígdala, el núcleo del hipotálamo ventromedial y la corteza piriforme. Además, en otras estructuras, como el núcleo accumbens, se ha observado activación neuronal relacionada con la preferencia sexual.

El VMH también es parte de la vía olfativa que transmite información que llega al MPOA. Los estudios sobre el VMH y el comportamiento sexual se han centrado principalmente en su papel crítico en la reproducción femenina. Lesiones,

estimulación, y estudios de implantes de hormonas esteroides realizados en ratas hembra revelan que los esteroides gonadales actúan sobre el VMH para modular el circuito neural que controla el despliegue de la conducta de lordosis (para revisión, ver Pfaff et al., 1994). A pesar de que el VMH contiene altas concentraciones de receptores de andrógenos, sólo un número limitado de estudios han examinado su papel en la expresión de comportamiento sexual masculino (McGinnis et al., 1996). En relación a la preferencia sexual, se ha demostrado que los andrógenos administrados selectivamente al VMH son tan eficaces para restaurar la preferencia sexual de animales castrados por hembras sexualmente receptivas, como los andrógenos administrados por vía sistémica (Harding & McGinnis, 2003). Esta observación está de acuerdo con un informe anterior que señaló que las ratas macho con lesiones de VMH tienen poca motivación sexual (Nisbett, 1972). Además, en otro estudio, se observó que los machos a los que se condicionó a preferir la compañía de otro macho -asociando el olor a almendra con la administración de quinpirol (un agonista dopaminérgico)- una vez que se exponían sólo al olor a almendra se expresó más inmunoreactividad a c-Fos (IR-Fos) en el VMH y en el núcleo accumbens *shell* (AcbSh) (Coria-Ávila et al., 2018). Este último diseño experimental puede tener la ventaja de que los animales no fueron manipulados hormonalmente durante su desarrollo.

La amígdala medial posterodorsal ha recibido una atención considerable como parte del circuito implicado en la regulación del comportamiento sexual. Esta zona cerebral es parte del sistema límbico y participa en la interpretación de señales olfativas, estimulación genitosensorial y la regulación del comportamiento social / sexual en roedores. Señales sexuales de las hembras activan las neuronas dentro de MePD de

ratones macho (Bergan et al., 2014; Aste et al., 2003). La MePD está involucrada en la regulación de aspectos motivacionales del comportamiento sexual como la investigación y la atracción hacia conespecíficos del sexo opuesto (Stark et al., 1998). La preferencia olfativa hacia señales del sexo opuesto se vio abolida por la lesión de la MePD (Kondo & Sachs, 2002), y este déficit en la preferencia de pareja estuvo acompañado por una prolongada latencia de monta y de eyaculación (Maras & Petrulis, 2006), lo que sugiere un papel crítico de MePD en la motivación sexual.

Varios estudios han demostrado que las señales feromonales transmitidas a través del AOB inducen la activación de c-Fos en la MePD (He et al., 2014). En apoyo a esta idea, un trabajo reciente encontró que la activación selectiva de las neuronas kisspeptidérgicas de la MePD produjo un aumento del tiempo invertido por ratones macho en la investigación de una hembra en estro, así como en la duración de la interacción social, indicando que las neuronas kisspeptidérgicas del MePD están involucradas en estos procesos (Adekunbi et al., 2018).

En machos con preferencia por sujetos de su mismo sexo (inducida por la administración perinatal de ATD) la exposición a aserrín proveniente de cajas de otros machos (Bakker et al., 1996b) o de hembras (Domínguez-Salazar et al., 2002) no provocó una respuesta en las partes externas de la vía vomeronasal que incluyen a la MePD o al núcleo postero ventral de la amígdala. Cabe mencionar que estas estructuras cerebrales participan en la integración de otros procesos emocionales, incluidos la ansiedad (Silveira et al., 1993; Fekete et al., 2009), la agresión (Haller, 2018) y el componente emocional de la transmisión dolorosa (Petrovic et al., 2004).

La amígdala basolateral (BLA) es una estructura asociada con el control de conductas dirigidas a metas y su lesión aumenta significativamente la impulsividad

(Winstanley et al., 2004), también se asocia al cálculo de costos y beneficios (Ghods-Sharifi et al., 2009) y al dolor (Jimenez-Velazquez et al., 2010). Sin embargo, en 2014 Hernández-González y colaboradores, demostraron que la inactivación de la amígdala basolateral mediante la lesión exitotóxica con tetrodotoxina (TTX) reduce la motivación sexual en ratas macho, ya que aumenta el tiempo para que los machos accedan a una hembra en un laberinto en T, y aumenta las latencias de monta intromisión y eyaculación (Hernández-González et al., 2014). Aunado a esto, se encontró que la lesión de BLA afecta la toma de decisiones sociales o en contextos sociales, lo que sugiere que esta estructura es importante para el aprendizaje social y la valoración afectiva de los estímulos sociales (Hernández-Lallement et al., 2016). Varios estudios han demostrado que las regiones cerebrales implicadas en el procesamiento de señales de feromonas sexuales envían proyecciones directas e indirectas a la vía dopaminérgica mesolímbica (Beier et al., 2015; Dulac & Wagner, 2006; Iyilikci et al., 2016; Watabe-Uchida et al., 2012). Además, la selección en una prueba de preferencia de pareja ocurre porque el sujeto seleccionado cuenta con estímulos suficientemente relevantes para elevar los niveles de dopamina cerebral en el macho experimental en áreas particularmente relevantes como el núcleo accumbens (Pfaus et al., 1990), que es una estructura asociada con la recompensa y la motivación sexual (West et al., 1992; Mitchell & Gratton, 1991).

De manera interesante algunos resultados sugieren que el núcleo accumbens se activa en sujetos que tienen preferencia por otros de su mismo sexo cuando son expuestos a estímulos provenientes o asociados con ellos. Así, se encontró que la exposición a estímulos olfativos (aserrín proveniente de cajas) de machos sexualmente activos aumentó la IR-Fos en machos con preferencia por sujetos de su

mismo sexo provocada por la administración perinatal de ATD (Bakker et al., 1996b). Y, como ya se mencionó, en otro estudio se observó que los machos a los que se condicionó a preferir la compañía de otro macho -asociando el olor a almendra con la administración de quinpirol- una vez que se exponían sólo al olor a almendra se expresó más IR-Fos en el AcbSh y en el VMH (Coria-Ávila et al., 2018).

Es importante destacar que se ha demostrado que la activación de las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas -mediante técnicas de optogenética que permiten registrar la actividad de regiones corticales y subcorticales- aumenta la interacción social entre ratones del mismo sexo, principalmente en hembras (Gunaydin et al., 2014). En un estudio reciente se exploró la secreción natural de DA en el núcleo accumbens (NAcc) durante la exposición a hembras de machos "wild type" y knockout al receptor de potencial transitorio 2 (TrpC2) que tiene una función importante en el órgano vomeronasal, por lo tanto, estos animales, perdían la preferencia por la hembra. La medición de DA se realizó mediante la técnica microdiálisis *in vivo*. Luego, se usó una manipulación optogenética para activar las proyecciones dopaminérgicas del área tegmental ventral (VTA) al NAcc de los ratones knockout TrpC2 con el fin de explorar si se puede restaurar la preferencia sexual hacia los estímulos femeninos. Por último, se evaluó la participación específica del receptor a dopamina tipo 1 (D1R) en el NAcc en la codificación del valor gratificante de las señales femeninas. Los resultados mostraron que la señalización dopaminérgica específica de la hembra en el NAcc está ausente en machos knockout TrpC2. También se encontró que la activación optogenética de las proyecciones dopaminérgica al NAcc en machos TrpC2^{-/-} restaura la preferencia olfativa hacia las hembras. Por último, se descubrió que el D1R desempeña un papel clave en la

mediación de las propiedades reforzantes de los estímulos femeninos para promover la preferencia olfativa en los machos (Beny-Shefer et al., 2017).

La corteza media prefrontal es una porción del cerebro de mamíferos que se caracteriza por su citoarquitectura y su organización específica (Kolb & Gibb, 2015) y a pesar de que no existe como tal en roedores, sí existen regiones frontales que cuentan con estas características (Kolb & Gibb, 2015; Kolb, 2007). La actividad de la corteza media prefrontal puede ser influenciada por las hormonas gonadales y se sabe que existen diferencias sexuales en su citoarquitectura, ya que las hembras tienen menor arborización que los machos (Kolb & Gibb, 2015). La corteza media prefrontal se involucra en funciones de alto orden del sistema nervioso central de los mamíferos, incluyendo regulación de emociones, ansiedad, flexibilidad conductual y toma de decisiones (Davis et al., 2010). Una de las funciones más importantes de esta estructura es la toma de decisiones basada en recompensas y en la adaptación conductual que permite a los sujetos seguir realizando conductas reforzantes. En este sentido, la conducta sexual es una conducta guiada a una meta (cópula) basada en recompensas naturales, por lo que es evidente el papel de esta estructura en su regulación (Davis et al., 2010). La inactivación de esta estructura aumenta las latencias de monta e intromisión en ratas macho, pero no se alteran otros parámetros de la conducta sexual, lo que indica que su participación es en el inicio de la conducta sexual, pero no en su ejecución (Agmo et al., 1995). En roedores se divide en corteza anterior del cíngulo (Acg), corteza prelímbica (Cx PL) e infralímbica (Cx IL) (Uylings et al., 2003).

La corteza anterior del cíngulo se ha implicado en el aprendizaje para discriminar estímulos visuales asociados a una recompensa y en la discriminación de estímulos

relativamente similares (Schweimer & Hauber, 2005). Además, se asocia a la toma de decisiones basadas en esfuerzo (Cardinal et al., 2003). Las cortezas prelímbica e infralímbica se asocian principalmente a la expresión de miedo condicionado, el aprendizaje aversivo y la búsqueda de drogas o la inhibición de estas mismas conductas (Riaz et al., 2019). Pero de manera interesante, también se asocian a conductas orientadas a metas (Shipman et al., 2018; Zeeb et al., 2015).

Se sabe que la mayoría de las neuronas del VTA activadas por conducta sexual conectan con la Cx PL e Cx IL y que a su vez éstas envían proyecciones a Nacc, MPOA, núcleo de la base de la estría terminalis (BNST) y BLA (Balfour et al., 2006) por lo que también podría estar implicada en la preferencia sexual.

Las técnicas más recientes de imagenología cerebral en humanos han permitido enriquecer el estudio de las estructuras cerebrales que participan en la preferencia sexual. En un estudio realizado en población homosexual, la activación de las estructuras hipotalámicas ante la presencia de feromonas masculinas depende de la preferencia sexual y no del sexo (Savic et al., 2005). En línea con lo anterior, se encontró que en sujetos homosexuales la actividad en el cíngulo anterior, hipotálamo, la amígdala, el hipocampo, el tálamo dorsomedial, la corteza media orbitofrontal, corteza visual y núcleo accumbens aumenta ante el estímulo de su preferencia (Safron et al., 2007).

Finalmente, se encontró que, en varones homosexuales, ante un estímulo visual de su preferencia, se activaron el giro angular izquierdo, el núcleo caudado del estriado izquierdo y el pálido derecho, las cuales no se activaron en el grupo de sujetos heterosexuales (Hu et al., 2008), lo cual establece nuevas estructuras asociadas a la preferencia sexual.

Los estudios sobre la preferencia sexual en roedores convergen en establecer que las áreas cerebrales que participan en este proceso incluyen al AOS, MPOA, la amígdala medial, VMH, NAcc, BNST y la corteza piriforme. En humanos las estructuras cerebrales que se encuentran relacionadas con la preferencia sexual son la corteza medio orbitofrontal, varias estructuras hipotálamicas, el tálamo, el giro angular izquierdo, el caudado izquierdo, el globo pálido derecho y la corteza visual. A pesar de las diferencias que existen entre las especies estudiadas, las estructuras que se encuentran en común son áreas hipotalámicas y corticales (Figura 8).

Estructuras cerebrales relacionadas con la preferencia sexual

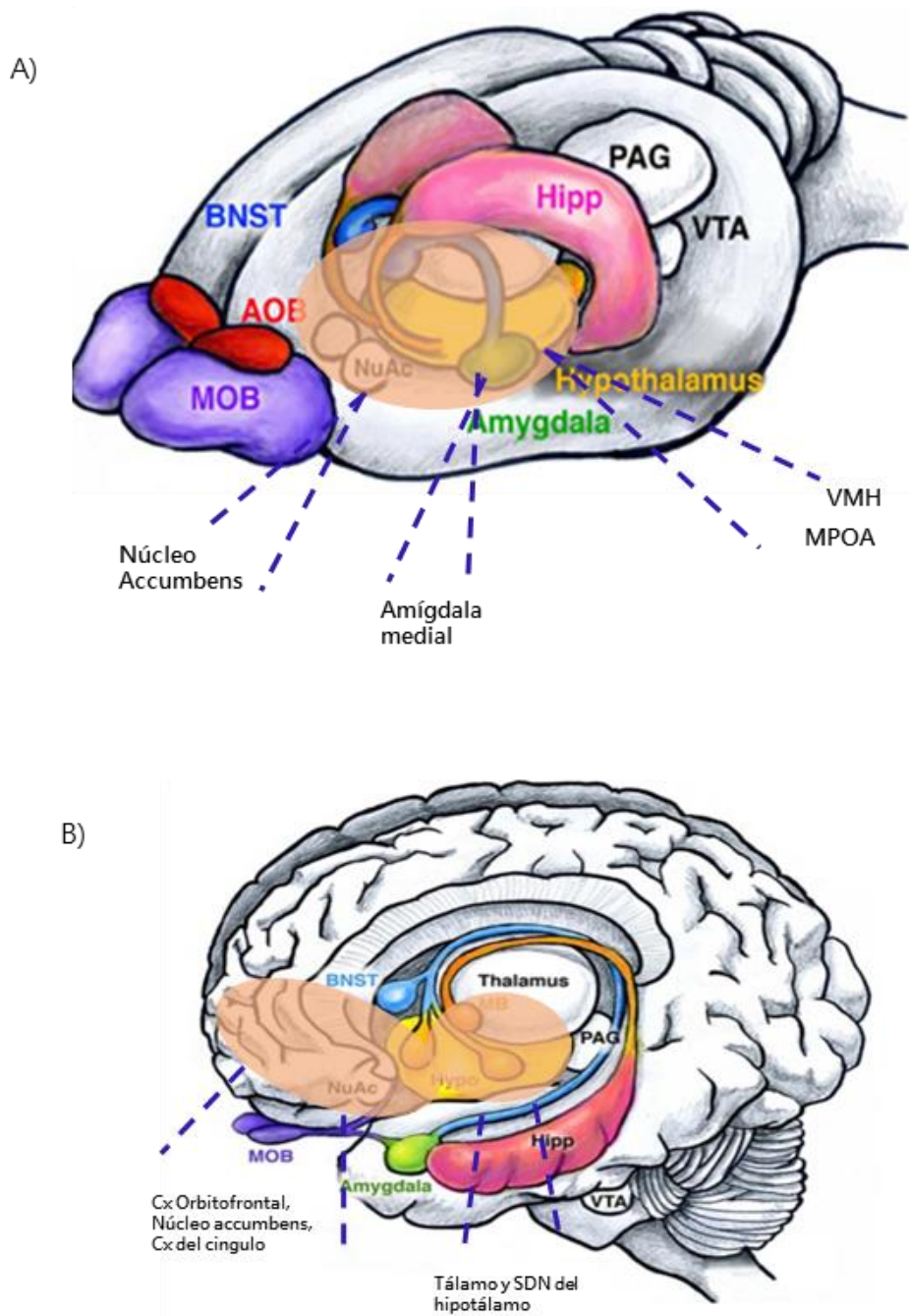


Figura 8. Estructuras cerebrales que se asocian a: A) Preferencia sexual en roedores. B) Orientación sexual en humanos.

5.2 Medición de la expresión de c-Fos como marcador de la actividad neuronal

El término gen de respuesta inmediata (immediate and early gene, IEG), fue usado a finales del siglo pasado para definir casi exclusivamente a los genes virales, los cuales se activan después de la integración a la célula infectada para reprogramar al huésped y permitir la replicación. Los genes homólogos a los IEGs en los eucariontes son, en su mayoría, proto-oncogenes, como *c-fos* y *c-jun* (Kovács, 2008).

De manera general, c-Fos ha sido el marcador anatómico de respuesta inmediata más ampliamente utilizado como herramienta para mapear células e incluso circuitos en el sistema nervioso central que se activan como respuesta a un estímulo (Kovács, 1998; 2008; Jaworski et al., 2018), debido a que: 1) se expresa en niveles muy bajos de manera basal, aunque algunas estructuras mantienen actividad constante, particularmente en el hipotálamo, 2) se induce de manera estereotipada en respuesta a señales extracelulares como iones, neurotransmisores, factores de crecimiento o drogas y 3) la activación es transitoria (alcanza su pico entre 1 y 3 horas después del estímulo y desaparece después de 4 ó 6 horas) y es fácil de detectar mediante técnicas de inmunohistoquímica (Kovács, 1998; 2008). A pesar de que comúnmente se menciona que la expresión de c-Fos se asocia a actividad cerebral es importante señalar que no es un indicador de toda la actividad neuronal, sino más bien de aquella actividad asociada a cambios en la conectividad como respuesta al estímulo que se presentó (Kovács, 2008). En diversos estudios se ha encontrado que la proteína c-Fos es marcador de actividad ante estímulos como: sueño, ciclo estral, cópula, lactancia, ambiente depredador y drogas, entre otros (Kovács, 2008).

Particularmente, asociado a la conducta sexual (Bialy & Kaczmareck, 1996; Robertson et al., 1991) y la preferencia sexual (Bakker et al., 1996b; Domínguez-Salazar et al., 2002) existen diversos estudios que ponen en evidencia que la actividad en estas estructuras puede ser evaluada mediante esta técnica.

CAPÍTULO 6

6.1 Justificación

Como resultado de las investigaciones en roedores, se sabe que existe un componente endócrino importante en el establecimiento de la preferencia sexual (Bakker et al., 1996a; Olvera-Hernández et al., 2015). Además, se conoce que la manipulación de los niveles de estrógenos durante el desarrollo perinatal mediante la administración de inhibidores de la aromatasa (ATD y letrozol) modifica la preferencia sexual de ratas macho en la adultez (Hernández & Fernández Guasti, 2018; Brand et al., 1991; Bakker et al., 1993; Olvera-Hernández et al., 2015; García-Cárdenas et al., 2015) confirmando que el componente hormonal es importante para el establecimiento de la misma; sin embargo, tras esta manipulación sólo se modifica la preferencia sexual de una proporción de sujetos del sexo masculino. Lo anterior podría explicarse si se considera que la preferencia sexual es el resultado de la interacción de varios factores. De hecho, se ha sugerido que la población de sujetos homosexuales puede estar formada de varios subgrupos con orígenes biológicos específicos y diferentes, es decir que no existe una causa única de la homosexualidad (Bocklandt et al., 2006). En consecuencia, es importante evaluar las posibles interacciones entre factores que han demostrado tener relevancia en el establecimiento de la preferencia sexual. Específicamente se desconoce cuál es el resultado de la interacción del componente hormonal con otros factores como la respuesta inmune o el estrés, que también están involucrados en la determinación de la preferencia sexual. Aunado a esto, se desconoce la posible activación diferencial de algunas estructuras cerebrales involucradas en la preferencia sexual entre individuos con preferencia por sujetos por su mismo o diferente sexo cuando son expuestos a un mismo

estímulo. Lo anterior podría ayudar a esclarecer un posible circuito de activación frente a la elección de un compañero sexual potencial.

6.2 Hipótesis Generales

Existirá una interacción entre algunos de los factores que se han identificado como participantes en la determinación de la preferencia sexual.

Las áreas cerebrales activadas ante la presencia de un sujeto del mismo sexo serán distintas en machos que prefieren al macho que en machos que prefieren a la hembra.

6.2.1 Hipótesis específicas

1. De manera espontánea habrá más sujetos machos con preferencia por otros de su mismo sexo en camadas sucesivas. Esta proporción aumentará aún más si las madres son tratadas con letrozol.
2. La aplicación de un protocolo de estrés a la madre durante la gestación, favorecerá la presencia de machos con preferencia sexual hacia su mismo sexo. La proporción de sujetos con esta preferencia aumentará si la madre es administrada simultáneamente con letrozol.
3. La actividad neuronal, indicada por la expresión de la proteína c-Fos, será distinta en las cortezas anterior del cíngulo (Acg), prelímbica (Cx PL) e infralímbica (Cx IL), el núcleo accumbens (NAcc) el área preóptica media (MPOA), el núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH), la amígdala medial postero dorsal (MePD) y basolateral (BLA), en machos que prefieren al macho comparados con los que prefieren a la hembra, ambos tratados con letrozol, ante la presencia de un estímulo del mismo sexo.

6.3 Objetivo general

Establecer si existe interacción entre los factores que potencialmente determinan la preferencia sexual y conocer si la activación de estructuras cerebrales específicas ante un estímulo sexual es distinta dependiendo de la preferencia sexual.

6.3.1 Objetivos específicos

1. Analizar si el número de machos con preferencia por otros machos se incrementa en camadas sucesivas (4 o más partos) de la misma madre y si esta cantidad aumenta bajo tratamiento prenatal con el inhibidor de aromatasas, letrozol.
2. Estudiar si en ratas hembra gestantes sometidas a estrés por inmovilización y tratadas con letrozol durante la gestación existe una proporción mayor de crías macho que cuando adultas prefieran a otros machos que los que provienen de madres con sólo uno de estos tratamientos.
3. Determinar mediante la expresión de la proteína c-Fos si existe una activación diferencial en las cortezas anterior del cíngulo (Acg), prelímbica (Cx PL) e infralímbica (Cx IL), el núcleo accumbens (NAcc) el área preóptica media (MPOA), el núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH), la amígdala medial postero dorsal (MePD) y basolateral (BLA), entre machos con preferencia por sujetos de su mismo sexo (tratados prenatalmente con letrozol) y machos que prefieren a la hembra ante la presencia de un macho sexualmente experto.

CAPÍTULO 7

7 Metodología

7.1 Metodología general

7.1.1 Animales

Se utilizaron ratas hembra y macho de la cepa Wistar con un peso aproximado de 250-300g, las cuales se alojaron en un bioterio con condiciones de temperatura controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) en un ciclo invertido de luz oscuridad (la luz se enciende a las 22:00 hrs) con libre acceso a agua y comida.

7.1.2 Administración prenatal de Letrozol

Se utilizaron ratas hembra con un peso aproximado de 200-250g. Las hembras en la fase de proestro se colocaron con un macho sexualmente experto al cual se le permitió realizar dos eyaculaciones sucesivas. Ese día se consideró como el día cero de la gestación. A partir del día gestacional 10 a las madres se les administró diariamente letrozol, a una dosis de $0.56\mu\text{g}/\text{kg}$, por vía subcutánea, hasta el día previo al parto (día 21 ó 22). Esta dosis fue elegida con base en trabajos previos (Olvera-Hernández et al., 2015; García-Cárdenas et al., 2015). Se ajustaron las camadas al nacimiento a 5 hembras y 5 machos (Figura 9).

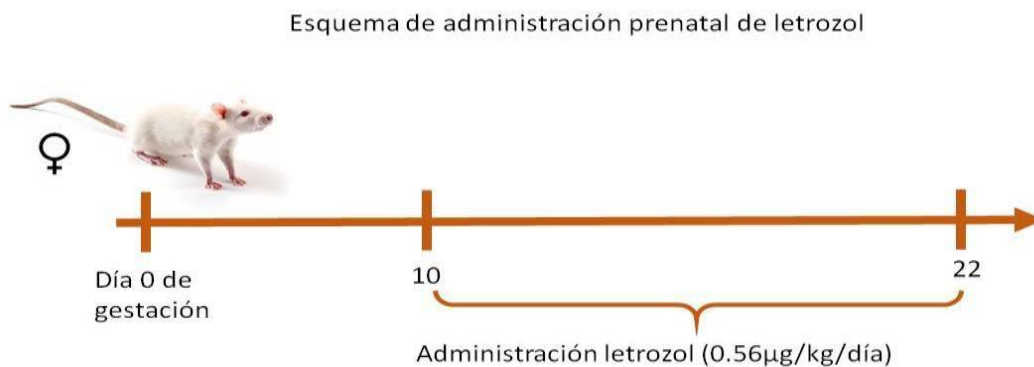


Figura 9. Esquema de administración prenatal de letrozol

7.1.3 Prueba de preferencia sexual

Para determinar la preferencia sexual, se utilizó la prueba de tres compartimentos (Brand et al., 1991; Olvera-Hernández et al., 2015). Los sujetos experimentales se colocaron en una caja dividida en tres compartimentos (ver Figura 6). En uno de ellos se alojó a un macho sexualmente experto, en otro, a una hembra sexualmente receptiva que se indujo mediante la administración de estradiol (10µg/rata) 24 horas antes de progesterona (4 mg/rata), que se administró 4 horas antes de la prueba de preferencia sexual. Los sujetos estímulo se fijaron con un arnés que les permitía moverse sólo en el compartimento asignado. En el compartimento central no se colocó ningún estímulo y se le denominó compartimento neutro. El aserrín de cada compartimento se obtuvo de la siguiente manera: para el compartimento del macho, se colocó aserrín proveniente de las cajas que alojaban a machos sexualmente expertos, tomado una noche después de que eyacularon en una sesión de conducta sexual; para el compartimento de la hembra, el aserrín utilizado fue el que provenía de cajas hogar que alojaban hembras que se encontraban receptivas el día previo a la prueba. La duración de esta prueba fue de 15 minutos y se evaluó el tiempo de permanencia en cada uno de los compartimentos y el tiempo de interacción con los estímulos mediante el software The Observer 5.0 (Noldus). Se define como interacción cualquier contacto que el sujeto experimental haya tenido con cada uno de los animales estímulo e incluye conductas de juego, olfateo, montas, intromisiones, eyaculaciones, orejeo, brincoteo, zigzagueo y conducta de lordosis.

Para determinar la preferencia sexual de los sujetos, se calculó el índice de preferencia mediante la división del tiempo de interacción con la hembra entre el tiempo de interacción con el macho. Un índice menor a 0.90 es indicador de una

clara preferencia sexual por el macho sexualmente experto (Olvera-Hernández et al., 2019). Los resultados de esta prueba se graficaron como el tiempo que el sujeto experimental pasó interactuando con la hembra sexualmente receptiva menos el tiempo que pasó con el macho sexualmente experto; valores positivos indican preferencia por la hembra y valores negativos preferencia por el macho (Hernández et al., 2020).

7.1.4 Pruebas de conducta sexual

Aunada a la evaluación de la preferencia sexual también se realizó la evaluación de la conducta sexual masculina y femenina en la prueba de preferencia con dos estímulos y en otra condición donde el macho estímulo sólo tuvo contacto con otro macho o con una hembra sexualmente receptiva. En ambas, se cuantificó el porcentaje de machos que realizaron las conductas de monta, intromisión y eyaculación en el caso de la conducta sexual masculina así como lordosis, proceptividad y montas recibidas por el macho sexualmente experto durante el tiempo de la prueba.

7.1.4.1 En la prueba de preferencia

Dado que la prueba de preferencia sexual permite la interacción con el estímulo se pudo evaluar la conducta sexual de los animales durante esta prueba (15 minutos).

7.1.4.2 En el redondel. Conducta sexual con la hembra receptiva y el macho experto.

Una semana después de la prueba de preferencia sexual se realizó la evaluación de la conducta sexual. Para esto, se colocaron a los machos en un redondel de

acrílico con una hembra sexualmente receptiva (ovarectomizada tratada con benzoato de estradiol (10µg/rata) 24 horas y progesterona (4 mg/rata) 4 horas antes de la prueba) y se le permitió interactuar con ella durante 30 minutos. Se cuantificó el porcentaje de animales que realizó montas, intromisiones y eyaculaciones. Pasado el tiempo establecido, se retiró a la hembra y se mantuvo al macho experimental en el redondel durante 5 minutos. Después de ese tiempo, se colocó a un macho sexualmente experto en el redondel durante 30 minutos y se cuantificó el porcentaje de machos que realizaron lordosis y conductas proceptivas, así como el porcentaje de machos que realizó montas hacia el macho sexualmente experto y que recibió montas de éste.

7.2 Metodología particular

7.2.1 Posibles factores que determinan la preferencia sexual

7.2.1.1 Gestaciones consecutivas y administración prenatal de letrozol: efecto sobre la preferencia sexual de la progenie masculina.

Para conocer si las gestaciones consecutivas de las madres incrementan la cantidad de sujetos macho con preferencia hacia su mismo sexo, se emplearon dos grandes grupos de hembras: primíparas jóvenes (4 meses de edad) y multíparas que, dada esta condición, eran de mayor edad (12 meses) que las primíparas jóvenes. Esos grupos a su vez se dividieron en: (1) control, las madres y las crías se mantuvieron intactas y (2) administración a las hembras gestantes de letrozol (0.56µg/kg) por vía subcutánea hasta el día previo al parto (día 21 ó 22). Se formó un grupo adicional de madres primíparas envejecidas (12 meses aproximadamente) como control de edad. En las hembras multíparas se analizó el

número de machos y hembras de esa camada y de camadas previas. Se incluyeron 3, 2 y 4 hembras con 4, 5 y 6 partos previos, respectivamente. Se decidió usar hembras con muchos (mínimo 4) partos previos para tener una condición extrema. Cuando las crías de sexo masculino de todos los grupos llegaron a la edad de 3 meses, se les evaluó la preferencia sexual y la conducta sexual (Figura 10). Para conocer si a mayor número de partos previos de la madre existe una mayor proporción de animales con preferencia hacia su mismo sexo, se realizó una correlación entre el número de partos previos de la madre y el índice de preferencia (ver arriba).

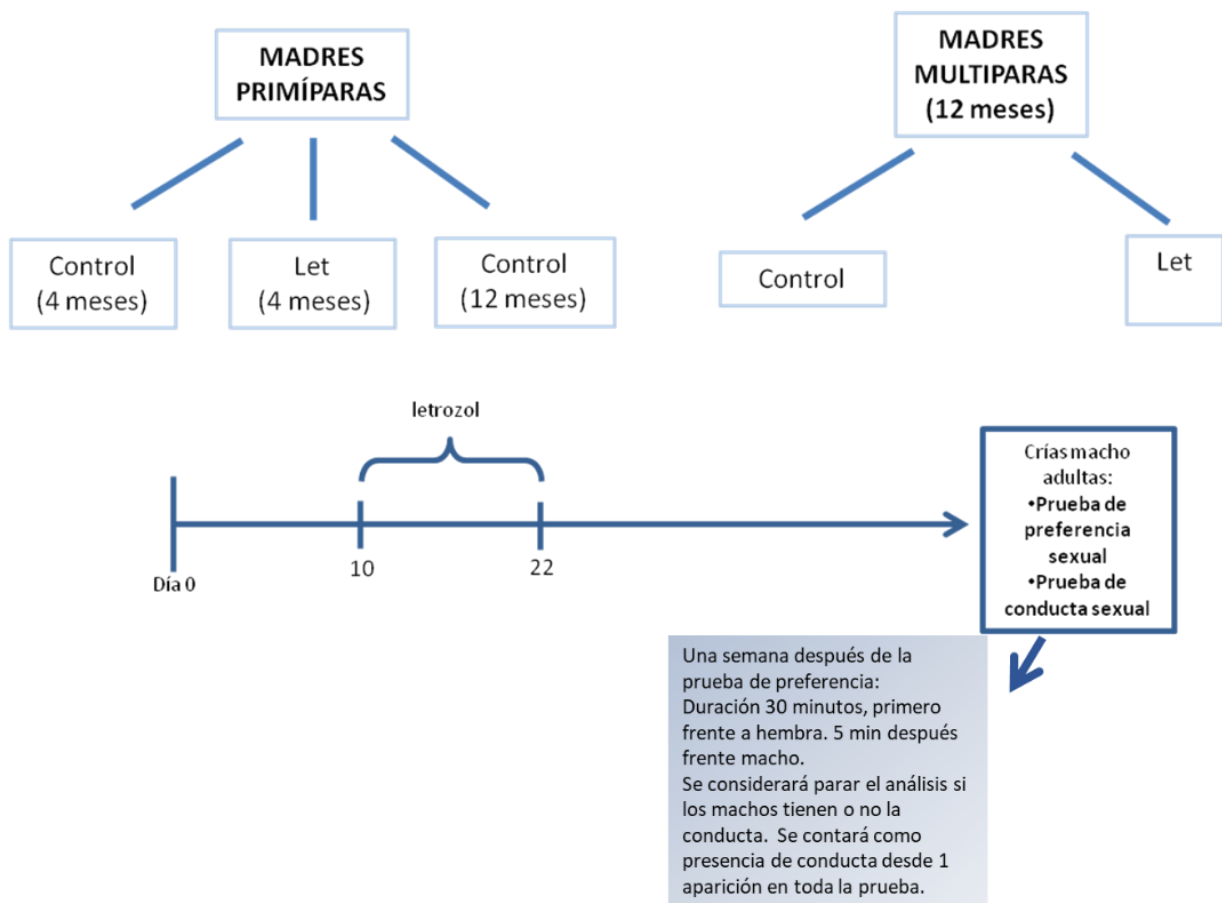


Figura 10. Protocolo de administración para obtener animales con múltiples gestaciones

7.2.1.2 Interacción entre el estrés de la madre y la administración prenatal de letrozol en la preferencia sexual de ratas macho en la etapa adulta.

Para inducir el estado de estrés en las madres gestantes, se efectuó un protocolo de estrés crónico por inmovilización, el cual ha sido ampliamente utilizado para inducir un estado de estrés en las madres durante la gestación (Weller et al., 1988; Smith et al., 2004). Este protocolo consiste en colocar a las hembras gestantes en cajas de restricción de movimiento durante 30 minutos diariamente desde el día gestacional 10 y hasta el día anterior al parto (G10-G-21). Se conformaron 4 grupos: Los grupos 1 y 2 consistieron en la administración de letrozol a las madres gestantes (grupo 1) y un grupo control (grupo 2) sin el estrés. El grupo 3 consistió en realizar el protocolo de estrés gestacional sin ninguna administración. Finalmente, al último grupo se le aplicó el protocolo de estrés al mismo tiempo que se le administró letrozol durante el mismo periodo. A las crías macho, cuando adultas, se les midió la preferencia sexual y la conducta sexual masculina y femenina, como ya se describió.

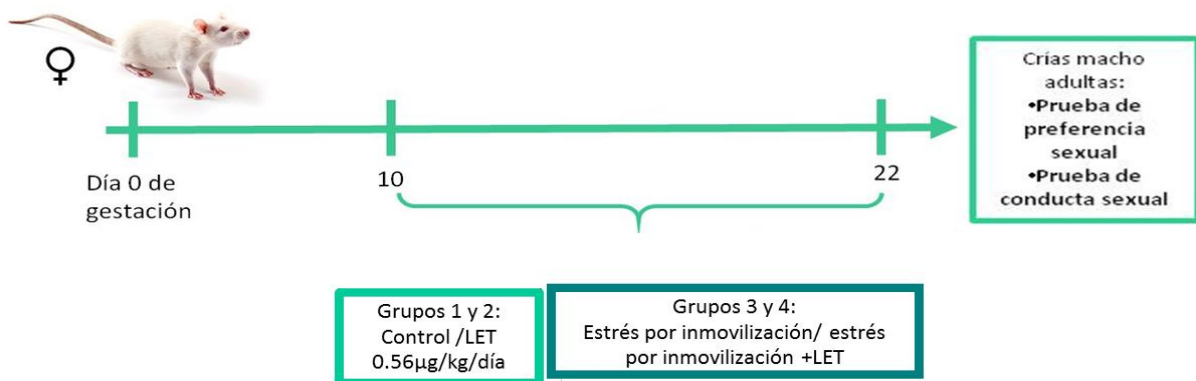


Figura 11. Protocolo de administración para evaluar la interacción de factores endocrinos y de estrés prenatal en la preferencia sexual

7.2.2 Áreas cerebrales y preferencia sexual

7.2.2.1 Determinación de la actividad cerebral mediante la cuantificación de c-Fos

En animales tratados prenatalmente con letrozol (0.56 µg/kg G10-21) se estableció la preferencia sexual mediante la prueba de tres compartimentos. Cabe recordar que sólo alrededor del 40% de estos sujetos mostrará preferencia por el macho (Olvera-Hernández et al., 2015; Hernández & Fernández-Guasti, 2018). Para controlar si los efectos observados se debían a la administración de letrozol o a la preferencia sexual que muestran los sujetos, se añadió un grupo control que no recibió tratamiento prenatal con letrozol y que mostraba preferencia sexual por la hembra sexualmente receptiva. Una vez determinada la preferencia sexual, se obtuvo un total de 30 machos, 10 nacidos de hembras sin tratamiento, naturalmente con preferencia por la hembra, 10 machos tratados con letrozol y con preferencia por la hembra y 10 machos también con letrozol, pero con una clara preferencia por el macho, indicada por un índice de preferencia menor de 0.8 (ver arriba, ver Olvera-Hernández et al., 2019). Una semana después de la prueba de preferencia, los tres grupos de animales se dividieron en dos: a 5 animales de cada grupo (control, letrozol preferencia por la hembra y preferencia por el macho) se les colocó en una arena circular de acrílico frente a un macho sexualmente experto al que podían aproximarse, olfatear, escuchar y ver, pero sin poder interactuar físicamente durante 20 minutos. La interacción con el estímulo se evitó debido a que los animales estuvieron divididos mediante una barrera de metal removible. Transcurridos 20 minutos, se retiró al estímulo y los machos experimentales se mantuvieron en una jaula sin manipulación hasta que pasaron 90

minutos después de la prueba conductual. Adicionalmente, los 5 animales restantes de cada grupo fueron colocados en la arena con la división y todos los elementos que contenía la prueba, pero omitiendo al macho estímulo. Estos grupos se incluyeron para controlar la activación de c-Fos por estímulos no específicos (caja, malla de separación, condiciones del cuarto, etc.) asociados a la exposición del macho sexualmente experto.

Posteriormente se realizó una perfusión intracardiaca con una solución de buffer de fosfatos (PBS) y paraformaldehído al 4% para la fijación del tejido cerebral (Figura 12). Los cerebros se congelaron y cortaron en un criostato a 40 μ m y el tejido fue almacenado en una solución de sacarosa (30%) para crioprotección. Finalmente, se realizó el procedimiento de inmunohistoquímica contra la proteína c-Fos, en Aqg, Cx PL, Cx IL, NAcc, MPOA, VMH, MePD y BLA que fueron ubicadas con el atlas Paxinos (Paxinos & Watson, 2004). Se tomaron 5 laminillas que contenían a cada estructura para dar profundidad, por lo que se contabilizó el total de muestras contadas bilateralmente en el total de animales. En la figura 12 se muestra el rango anteroposterior con respecto al atlas de Paxinos que se utilizó como referencia para delimitar la estructura (mm respecto a bregma) y el área de cada una de ellas en milímetros cuadrados (mm²). Se añaden también ilustraciones representativas de las estructuras que fueron seleccionadas para el análisis (señaladas por una sombra).

Área cerebral	Zona de interés (mm ²)	Rango (mm)
Corteza anterior del cíngulo	1.49	5.2 a 3.2
Corteza Prelímbica	1.49	5.2 a 3.2
Corteza infralímbica	1.49	5.2 a 3.2
Núcleo accumbens	1.49	2.7 a 0.7
Area preóptica medial	0.74	-0.3 a -1.3
Hipotálamo ventromedial	0.25	-2.3 a -3.3
Amígdala medial posterodorsal	0.25	-1.8 a -3.8
Amígdala Basolateral	0.25	-1.4 a -4.8

Tabla 1. Áreas cerebrales de interés, tamaño de la estructura en mm² y rango que se consideró con respecto a bregma en el atlas de Paxinos.

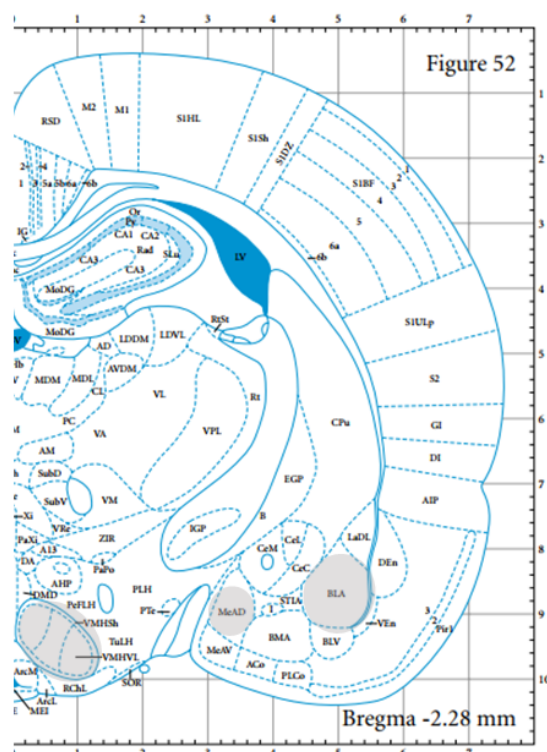
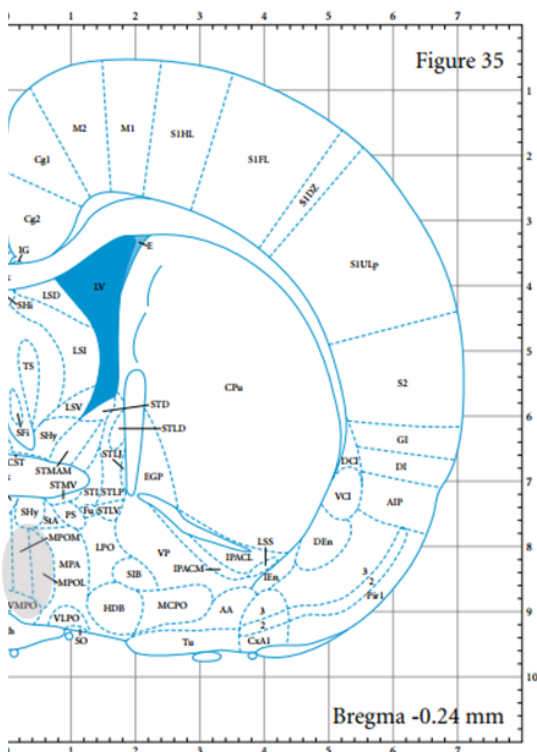
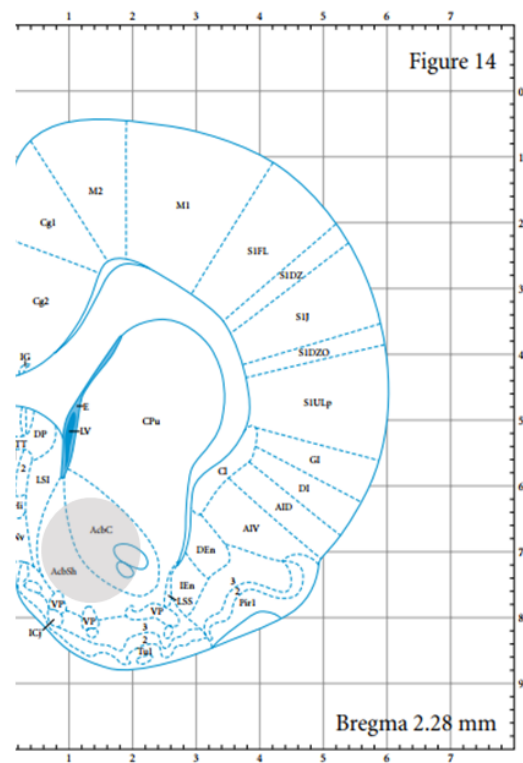
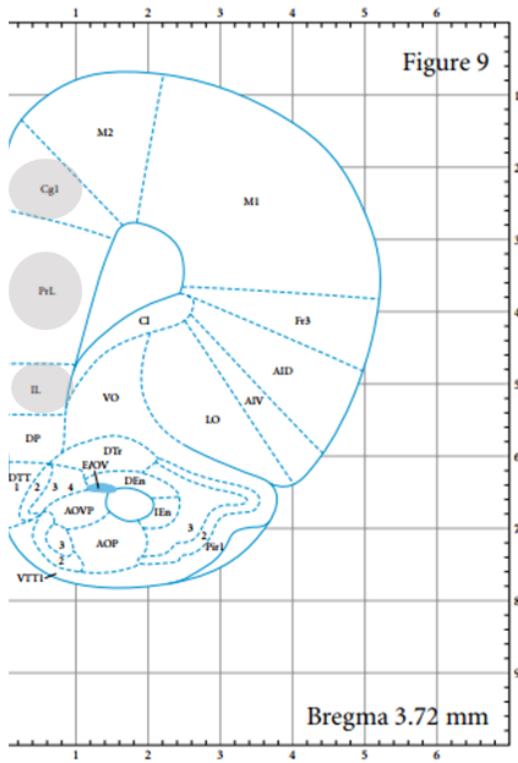


Figura 12. Áreas cerebrales de interés, tamaño de la estructura en mm² y rango que se consideró con respecto a bregma en el atlas de Paxinos.

El protocolo de inmunohistoquímica se explica brevemente a continuación: el tejido se lavó con una solución de buffer de fosfatos (PBS) y posteriormente se incubó en una solución de borohidrato de sodio al 1% (Sigma Aldrich), posteriormente, las secciones se incubaron con peróxido de hidrógeno al 1%. Una vez realizado lo anterior, se hicieron más lavados con PBS, después, el tejido se incubó con el anticuerpo primario (Abcam ab209794) a una dilución 1:10000 por 36 horas a 4° C sin agitación. Una titulación previa en el laboratorio estableció esa como la mejor dilución. Después de los lavados, se utilizó el anticuerpo secundario (Vectorlabs BA-1000), dirigido contra proteínas provenientes del suero de cabra biotinilado y acoplado a la peroxidasa) a una dilución 1:600 por 2 horas. Finalmente, el tejido fue lavado e incubado en una solución de diaminobencidina (Vector Laboratories, USA) y se fijaron los tejidos mediante el uso de resina sintética al 60% en xilol (Sigma, México). Las muestras fueron fotografiadas mediante un microscopio óptico (Carl Zeiss Axiostar) y el programa Motic Images Plus 3.0 (X64). Una vez obtenidas las imágenes se procesaron mediante el software Image J (Fiji) para realizar el conteo de las células inmunoreactivas. Los resultados se expresan como número de células por milímetro cuadrado.

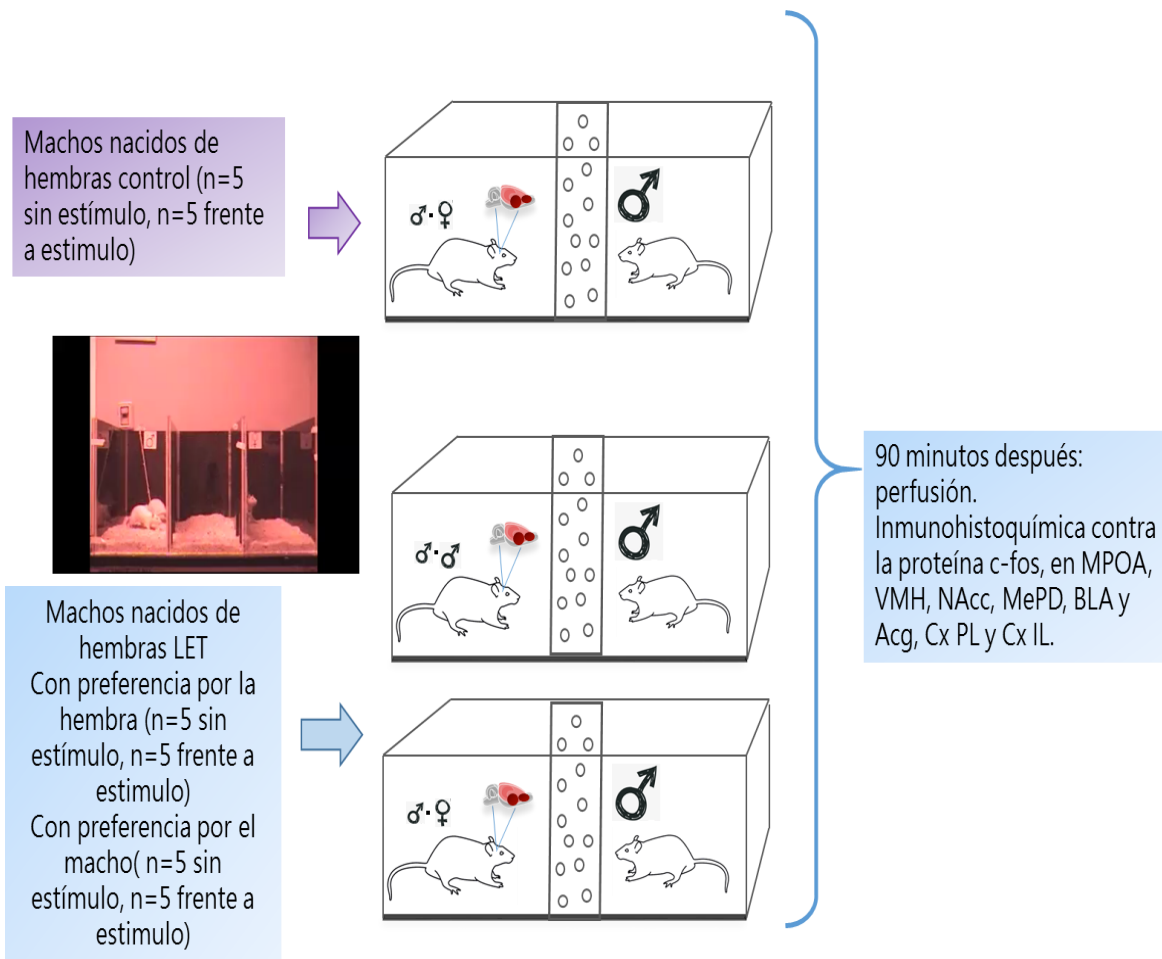


Figura 13. Protocolo de medición de la actividad cerebral ante un macho sexualmente experto

7.3 Análisis estadístico

Para determinar la preferencia sexual de los animales se calculó el índice de preferencia (ver arriba, ver Olvera-Hernández et al., 2019).

General: Para analizar las proporciones se realizó una Prueba exacta de Fisher. El tiempo que los animales pasaron interactuando con los estímulos se analizó mediante un ANOVA de una vía seguido de una prueba *pos hoc* Tukey.

Objetivo 1: Para analizar la composición de la camada se realizó una prueba t de student no pareada y se muestra la media del número de crías y su sexo \pm error

estándar. Para evaluar la relación entre el número de partos previos de la madre y el índice de preferencia de los animales se realizó una correlación de Spearman.

Objetivo 2: Durante las pruebas de conducta sexual en el redondel, el número de conductas se analizó mediante un ANOVA Kruskal Wallis, seguido de U de Mann Whitney.

Objetivo 3: El número de células inmunoreactivas a c-Fos se respresenta por la media \pm error estandar y las diferencias se analizaron con un ANOVA de dos vías donde los factores fueron: exposición/no exposición al estímulo y tratamiento prenatal/preferencia, seguido de la prueba *pos hoc* de Tukey.

CAPÍTULO 8

8 Resultados

8.1 Posibles factores que determinan la preferencia sexual

8.1.1 Gestaciones consecutivas y administración prenatal de letrozol: efecto sobre la preferencia sexual de la progenie masculina.

8.1.1.1 Composición de la camada

Los 91 machos experimentales que fueron utilizados en este estudio provinieron de 28 camadas: 8 de hembras primíparas jóvenes, 11 de madres primíparas envejecidas y 9 de hembras multíparas. Las camadas de las hembras primíparas jóvenes tuvieron una media de 5.3 (± 0.7) machos y 4.5 (± 0.5) hembras, mientras que los animales nacidos de las primíparas envejecidas tuvieron un número de machos reducido 2.8 (± 0.6) (prueba t de Student no pareada, $p < 0.05$), pero una cantidad similar de hembras 3.4 (± 0.4).

En el grupo de animales nacidos de multíparas la media de animales por camada fue de 4.2 (± 0.4) machos y 4.4 (± 0.6) hembras, estos valores no difieren del número de machos y hembras nacidos en los partos previos de esas mismas madres (4.8 (± 0.4) machos y 4.3 (± 0.6) hembras; prueba t de Student no pareada, N.S) o del número de animales nacidos de hembras primíparas viejas (prueba t no pareada, N.S). Las hembras multíparas tuvieron al menos dos machos por camada con un promedio total de machos nacidos de 18 (± 1.3), con un rango que fue de 12 a 24. En el caso de los grupos de machos sin hermanos mayores (hijos de hembras primíparas), únicamente un sujeto de todas las camadas mostró preferencia por sujetos de su mismo sexo (ver abajo), En el grupo de machos con hermanos mayores (hijos de multíparas) no hubo alguna camada en la que todos los machos

tuvieran preferencia por el macho y hubo 2 camadas en las que ningún macho mostró preferencia por sujetos de su mismo sexo.

8.1.1.2 Preferencia sexual

Cuando se determinó la preferencia sexual en la progenie de sexo masculino de madres con diferente número de partos previos, se encontró que en los sujetos cuyas madres fueron primíparas, independientemente de la edad [jóvenes (1/28) envejecidas (1/25)], el 4% de los machos tuvo preferencia por individuos de su mismo sexo (Prueba exacta de Fisher, $p > 0.99$). En contraste, en el grupo de machos cuyas madres habían tenido 4 partos o más, el porcentaje de machos con preferencia por sujetos de su mismo sexo fue de 39% (15/38) (Prueba exacta de Fisher, $p < 0.001$). Ver tabla 2:

Preferencia sexual		
	Machos con preferencia por la hembra	Machos con preferencia por el macho
Primíparas jóvenes	27/28 96%	1/28 4%
Primíparas envejecidas	24/25 96%	1/25 4%
4 o más partos	23/38 61%***&&&	15/38 39%***&&&

Tabla 2. Proporción de animales con preferencia por la hembra o el macho y con distintas condiciones. *** $p = 0.001$ vs. primíparas jóvenes; &&& $p = 0.001$ vs. primíparas envejecidas. Prueba exacta de Fisher.

Al evaluar el tiempo de interacción con los estímulos en la prueba de preferencia sexual de los animales cuyas madres habían tenido 4 o más camadas, se encontró una población de machos que preferían interactuar con la hembra receptiva y otra población que prefería interactuar con el macho (Figura 14). No se encontraron diferencias significativas en el tiempo de interacción en los grupos de machos que prefieren a la hembra sin importar la edad de la madre (ANOVA de 1 vía $F_{(2, 43)} = 1.38$ $p=0.26$). De manera interesante, el grupo de machos que tenía hermanos mayores (nacidos de madres multíparas) pasaron menos tiempo interactuando con la hembra (ANOVA de una vía, $F_{(2,88)} = 11.62$; $p < 0.001$) y más tiempo interactuando con el macho sexualmente experto ($F_{(2,88)} = 5.36$; $p = 0.006$) sin que se modificara el tiempo total en el compartimento medio, ($F_{(2,88)} = 1.48$; $p = 0.23$).

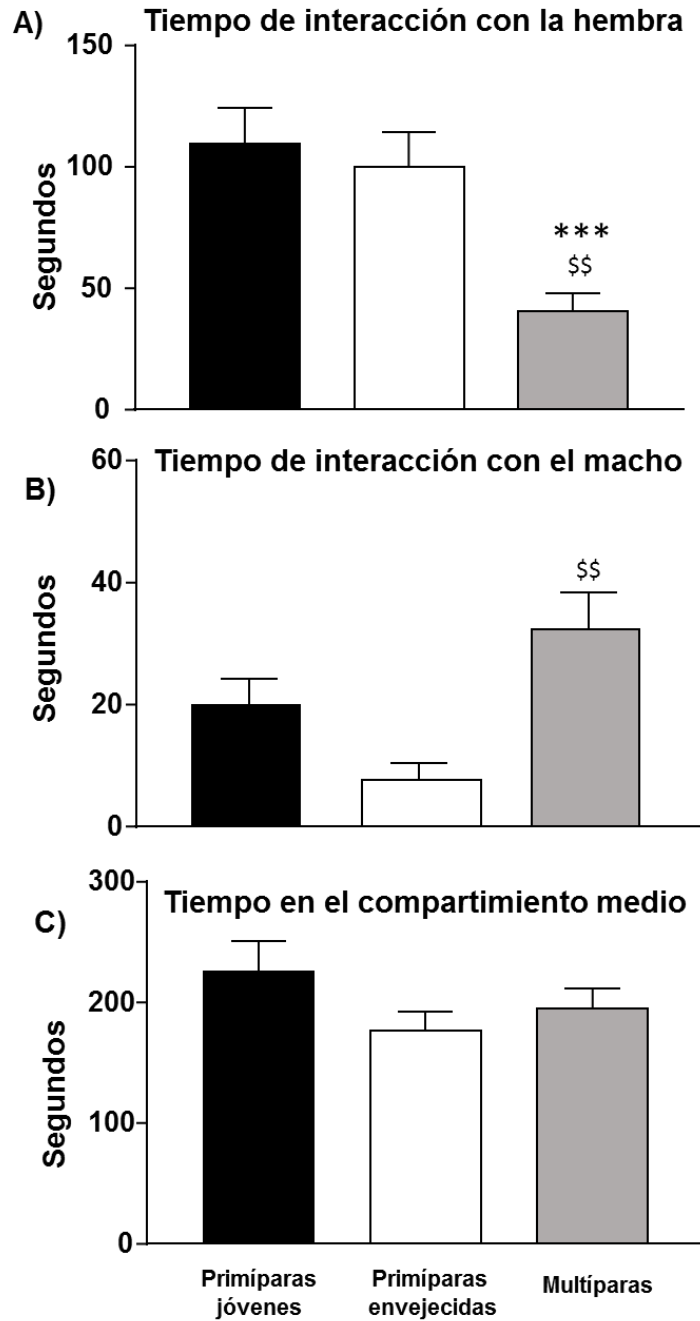


Figura 14. Tiempo de interacción en la prueba de preferencia sexual con A) hembra receptiva B) macho sexualmente experto y C) tiempo en el compartimiento medio en machos sin hermanos mayores (nacidos de primíparas jóvenes, n=28 barras negras ó nacidos de primíparas envejecidas, n=25 barras blancas) y machos con hermanos mayores (nacidos de hembras múltiparas (n=38, barras grises). ANOVA de una vía pos hoc Tukey, ***p<0.001 vs. primíparas juvenes; \$\$ p<0.01 vs. primíparas envejecidas.

Adicionalmente, se calculó la relación que existe entre el número de partos previos y el índice de preferencia en el total de la población, esto para conocer si a mayor número de partos hay mayor índice de preferencia. Se encontró una correlación negativa entre el número de partos y el índice de preferencia (Correlación de Spearman, $r=-0.26$; $p<0.01$), es decir, el índice de preferencia disminuye cuando el número de partos se incrementa; sin embargo, esta correlación se pierde ($r=0.06$; $p=0.68$) cuando sólo se consideran los machos nacidos de madres multíparas (4, 5 ó 6 gestaciones).

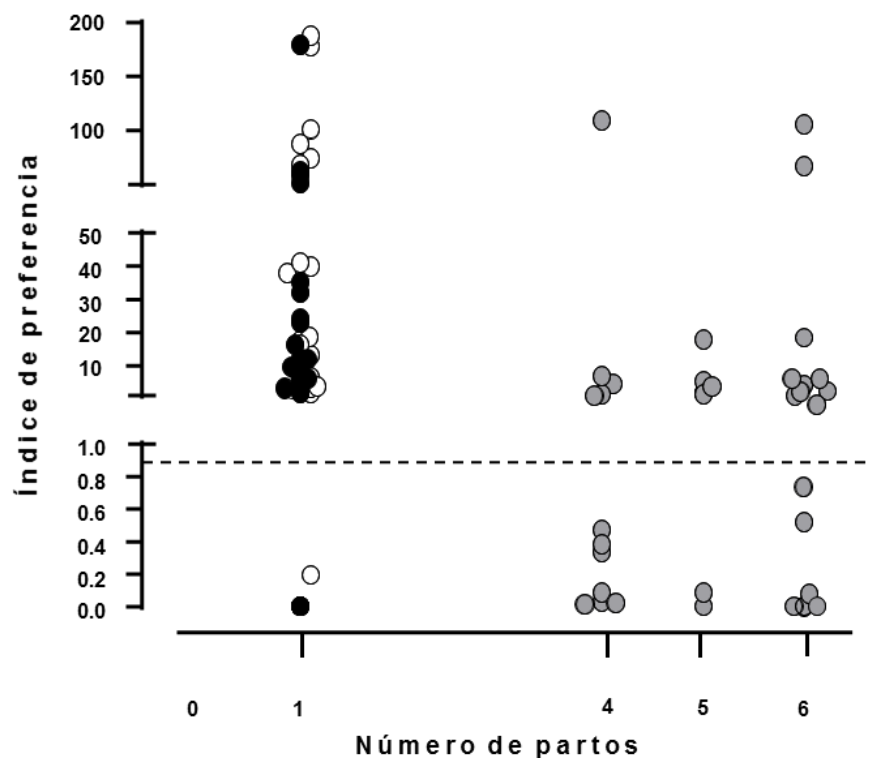


Figura 15. Relación entre el índice de preferencia y la presencia de hermanos mayores. Los índices de preferencia de los machos sin hermanos mayores, nacidos de hembras primíparas jóvenes se muestran en puntos negros y los de hijos de hembras primíparas envejecidas en puntos blancos. Los índices de preferencia de los machos nacidos de hembras multíparas se representan con puntos grises. Correlación de Spearman considerando todos los grupos: $r=-0.26$; $p=0.01$. Correlación de Spearman considerando únicamente el índice de preferencia de machos nacidos de madres multíparas: $r=0.06$; $p=0.68$. Los índices de preferencia por debajo de la línea punteada (0.89) corresponden a animales con preferencia por sujetos de su mismo sexo.

8.1.1.3 Conducta sexual en la prueba de preferencia

Cuando se evaluó la conducta sexual en la prueba de preferencia sexual, encontramos que alrededor de la mitad de los machos nacidos de hembras primíparas jóvenes (57%), envejecidas (64%), o nacidos de multíparas y con preferencia por la hembra (44%) realizaron montas a la hembra sexualmente receptiva. Sin embargo, este porcentaje se reduce significativamente en el grupo de machos nacidos de madres multíparas y con preferencia por el macho, en donde sólo el 9% montó a la hembra sexualmente receptiva (Prueba exacta de Fisher; $p < 0.05$ vs. primíparas jóvenes y $p < 0.01$ vs. primíparas envejecidas). De manera similar ocurre con la intromisión, donde una tercera parte de los animales de los primeros grupos (con preferencia por la hembra) mostraron esta conducta (33, 36 y 22%), mientras que en el grupo de animales con preferencia por el macho -nacidos de multíparas- ningún macho realizó la conducta de intromisión (0%). Esta reducción fue estadísticamente significativa cuando se comparó con el grupo de machos nacidos de hembras primíparas envejecidas (Prueba exacta de Fisher; $p < 0.05$). Durante la prueba de preferencia (de 15 minutos de duración) únicamente un macho del grupo de machos nacidos de madres primíparas jóvenes, eyaculó; ningún macho de los otros grupos realizó esta conducta.

En los grupos de machos nacidos de hembras primíparas ninguno de los machos experimentales recibió montas por parte del macho sexualmente experto, mientras que un 36% de los machos nacidos de multíparas y con preferencia por el macho recibió montas del macho sexualmente experto (Prueba exacta de Fisher; $p < 0.05$ vs. grupos de machos nacidos de primíparas). No se encontraron diferencias entre los grupos en los porcentajes de animales que emitieron montas hacia el macho sexualmente experto.

8.1.1.4 Pruebas de conducta sexual

Una semana después de la prueba de preferencia sexual, se realizó una prueba de conducta sexual (30 minutos cada una) en una arena cilíndrica ante un estímulo (primero con una hembra sexualmente receptiva y después con un macho sexualmente experto, ver métodos), la figura 16 muestra el porcentaje de machos que ejecutan conducta sexual masculina o femenina.

8.1.1.4.1 Conducta sexual con la hembra receptiva

No se encontraron diferencias entre los grupos en el porcentaje de machos que realizó montas o en el número de montas; sin embargo, se observó una disminución en los porcentajes de machos que intromitieron o eyacularon únicamente en el grupo de machos nacidos de multíparas y con preferencia por el macho (Figura 16, panel A, prueba exacta de Fisher, $p < 0.05$).

8.1.1.4.2 Conducta sexual con el macho sexualmente experto

Como se esperaba, ningún macho de los grupos nacidos de hembras primíparas (jóvenes o envejecidas) mostró proceptividad o conducta de lordosis (Figura 16, panel B). Sin embargo, el porcentaje de machos que mostró proceptividad fue mayor en el grupo de machos nacidos de multíparas, sin importar su preferencia sexual; a pesar de que el porcentaje de machos que mostraron proceptividad fue aún mayor en los machos con preferencia por el macho (Prueba exacta de Fisher, $p < 0.001$ vs. primíparas jóvenes y $p < 0.01$ vs. primíparas envejecidas). El porcentaje de machos que presentó lordosis fue también drásticamente mayor sólo en los machos nacidos de madres multíparas y con preferencia por el macho (Prueba exacta de Fisher, $p < 0.001$ vs. grupos de primíparas).

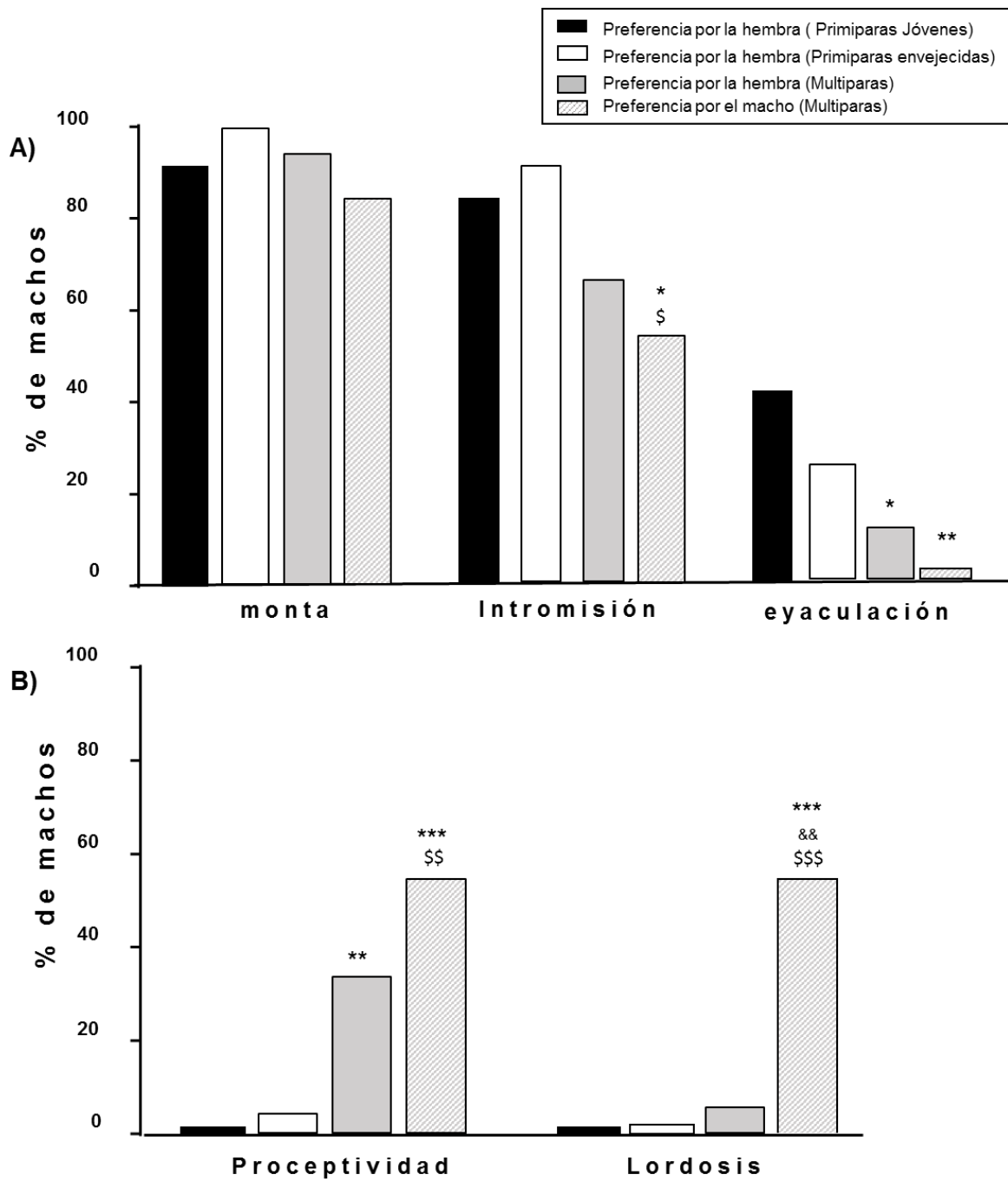


Figura 16. Prueba de conducta sexual. Porcentaje de machos que realizan A) conducta sexual masculina y B) femenina. Prueba exacta de Fisher: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. machos nacidos de primíparas jóvenes; \$ $p < 0.05$; \$\$ $p < 0.01$; \$\$\$ $p < 0.001$ vs. machos nacidos de primíparas envejecidas; && $p < 0.01$ vs. machos con preferencia por la hembra y nacidos de madres múltiparas.

8.1.1.5 Evaluación de la interacción: tratamiento prenatal de letrozol y multiparidad.

Para cubrir este objetivo se administró letrozol, a la dosis de 0.56 μ g/kg a hembras gestantes que previamente habían tenido al menos 4 partos previos. Este grupo de interacción entre ambos factores (inhibición de aromatasa y multiparidad) no pudo ser completado debido a la dificultad para obtener la descendencia. Como se muestra en la siguiente tabla, algunos partos no llegaron a término o bien, los animales no lograron sobrevivir, ya sea por abandono de la madre o por causas no especificadas.

Número de hembras multíparas tratadas con LET 0.56 μ g/kg	15
Hembras que no llegaron a término	8
Camadas que no sobrevivieron	5
Camadas que sobrevivieron	2

Tabla 3. Inviabilidad para desarrollar el objetivo asociado a la interacción entre la multiparidad y el tratamiento con letrozol.

8.1.2 Interacción entre el estrés prenatal y la administración de letrozol en la preferencia sexual de ratas macho en la edad adulta

8.1.2.1 Preferencia sexual

El siguiente objetivo consistió en evaluar la interacción entre el estrés durante la gestación G10-G21 y la administración de letrozol durante este mismo periodo. Los resultados muestran que el 31% de los machos nacidos de madres estresadas durante la gestación presentaban, cuando adultos, preferencia sexual hacia individuos de su mismo sexo. El tratamiento prenatal con letrozol provocó que 40% de los sujetos mostraran esta preferencia sexual cuando adultos. El siguiente paso, consistió en averiguar si existía una interacción entre estos dos factores. Cuando las madres recibieron un tratamiento de letrozol junto con el protocolo de estrés prenatal, se encontró un 50% de machos con preferencia por sujetos de su mismo sexo, esta proporción no es diferente de la encontrada en los grupos con los tratamientos de manera independiente y sólo difiere respecto a la observada en el grupo control (Prueba exacta de Fisher $p < 0.05$ y $p < 0.01$), como lo muestra la tabla 4. De manera interesante, en los grupos de animales estresados hubo algunos sujetos que no mostraron preferencia por ninguno de los sujetos estímulo y permanecieron la mayor parte de la prueba en el compartimento neutro. Esos animales fueron descartados de los siguientes análisis.

Preferencia sexual			
	Machos con preferencia por la hembra	Machos con preferencia por el macho	Machos que no interactúan
Control	20/21 95%	1/21 5%	0/21 0%
LET	19/32 60%**	13/32 40%**	0/30 0%
Estrés	10/19 53%*	6/19 31%*	3/19 16%
Estrés+LET	8/18 45%**	9/18 50%**	1/18 5%

Tabla 4. Proporción de animales con preferencia por la hembra, por el macho o que no interactúan con los estímulos en la prueba de preferencia después de un tratamiento con letrozol, con estrés prenatal o con la combinación de ambos tratamientos. Prueba exacta de Fisher. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ vs. control no estresado.

Se determinó el tiempo que los animales pasaron interactuando con el estímulo preferido (figura 17). Los animales se dividieron en dos grandes grupos de acuerdo con su preferencia sexual; las barras superiores de la gráfica 17 muestran el tiempo de interacción con la hembra de los sujetos que tuvieron preferencia por la hembra en los diferentes tratamientos, mientras que las barras inferiores muestran el tiempo de interacción con el macho de los individuos que tuvieron preferencia por ese sexo. Dado que sólo un macho del grupo control mostró preferencia espontánea por el macho, no se pudo calcular una media y por lo tanto no se graficó. Claramente en todos los grupos de animales que nacieron de madres estresadas durante la gestación, disminuyó el tiempo de interacción con el estímulo de su preferencia. En aquellos que prefirieron a la hembra, la única diferencia

estadísticamente significativa se observó en el grupo de machos estresados y tratados prenatalmente con letrozol (barras punteadas, ANOVA de 1 vía $F_{(3,52)} = 4.32$; $p=0.01$, pos hoc Tukey $p<0.05$). De manera similar, se encontró una reducción en el tiempo de interacción con el macho en el grupo de machos con preferencia por sujetos de su mismo sexo en los grupos de animales estresados prenatalmente y con la combinación de tratamientos (estrés más tratamiento con letrozol) (barras punteadas) comparado con aquellos que recibieron únicamente letrozol (ANOVA de 1 vía $F_{(2,24)} = 7.3$; $p=0.01$ pos hoc Tukey $p<0.01$).

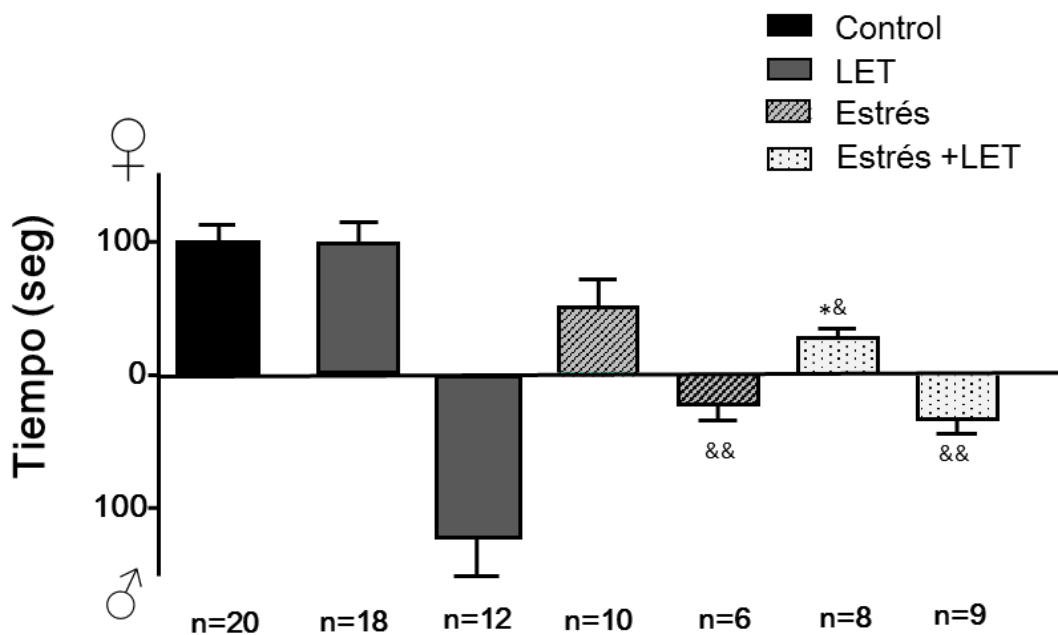


Figura 17. Tiempo de interacción con el estímulo preferido en machos tratados con letrozol, sometidos a estrés prenatal y con una combinación de los tratamientos (estrés + letrozol). Las barras superiores representan preferencia por la hembra y las barras inferiores los grupos con preferencia por el macho. ANOVA de una vía pos hoc Tukey. * $p<0.05$ vs. control, & $p<0.05$ vs. LET con preferencia por la hembra; && $p<0.01$ vs. LET con preferencia por el macho.

8.1.2.2 Conducta sexual en la prueba de preferencia

Cuando se analizó la conducta sexual en la prueba de preferencia (caja de tres compartimentos) se encontró una disminución en el porcentaje de machos que emitieron montas hacia cualquier estímulo (macho o hembra) o que intromitieron con la hembra y un incremento en el porcentaje de animales que recibieron montas del macho estímulo en el grupo de machos que recibieron los dos tratamientos prenatales combinados (Prueba exacta de Fisher, $p < 0.05$, Tabla 5).

Conducta sexual en la prueba de preferencia sexual				
	Monta a la hembra receptiva	Intromisión a la hembra receptiva	Monta al macho	Monta del macho
Control	57 (12/21)	33 (7/21)	38 (8/21)	0 (0/21)
LET	43 (13/30)	37 (11/30)	30 (9/30)	16 (5/30)
Estrés	25 (4/16)	6 (1/16)	19 (3/16)	6 (1/16)
Estrés+LET	6* (1/17)	0* (0/17)	6* (1/17)	23* (4/17)

Tabla 5. Proporción y porcentaje de animales que realizan conducta sexual con la hembra receptiva o con el macho sexualmente experto durante la prueba de preferencia sexual en animales control, después de un tratamiento con letrozol, con estrés prenatal o con la combinación de ambos. Prueba exacta de Fisher. * $p < 0.05$ vs. control.

8.1.2.3 Pruebas de conducta sexual

8.1.2.3.1 Conducta sexual con la hembra receptiva

Los resultados se muestran en la parte izquierda de la tabla 6. Al evaluar la conducta sexual masculina no se encontraron diferencias entre los grupos en el porcentaje de machos que realizaron montas, independientemente de los

tratamientos, sin embargo el número de montas sí disminuyó en los machos cuyas madres se sometieron a estrés durante la gestación (ANOVA Kruskal Wallis; $H(3)=17.1$, $p= 0.0007$; U de Mann Whitney, $p<0.01$ vs controles). Contrario a la conducta de monta, el porcentaje de machos que intromitieron se redujo significativamente en los grupos estresados (estrés, estrés + letrozol; Prueba exacta de Fisher, $p<0.01$, vs control), incluso se encontraron diferencias cuando se compararon con el grupo que sólo recibió letrozol (Prueba exacta de Fisher, $p<0.05$); de igual manera, el número de intromisiones también se redujo significativamente (ANOVA Kruskal Wallis; $H(3)=14.64$, $p=0.002$; U de Mann Whitney, $p<0.001$ y $p<0.01$). De manera interesante, en los grupos de machos cuyas madres fueron estresadas, la conducta de eyaculación se redujo significativamente ya que ninguno de estos machos eyaculó (Prueba exacta de Fisher, $p<0.05$ y $p<0.01$ vs control). Todos estos efectos resultaron asociados al estrés materno prenatal, ya que se observaron en ambos grupos (estresados y estresados más tratamiento con letrozol) y no hubo diferencias entre ellos, es decir, el tratamiento con letrozol no provocó un efecto deletéreo mayor.

8.1.2.3.2 Conducta sexual con el macho sexualmente experto

Los resultados de esta prueba se muestran en la parte derecha de la tabla 6. De manera espontánea los machos control no muestran conducta de lordosis (0%); sin embargo, en los grupos de machos que se sometieron a alguno de los tratamientos prenatales, ya sea solos o en combinación, se encontró una proporción de animales que presentaron esta conducta (33% en el grupo tratado con letrozol, 25% en el grupo de estrés y 35% en el grupo de la combinación); aunado a esto, el cociente

de lordosis (LQ, definido como número de lordosis entre el número de montas recibidas por el macho X 100) fue muy alto (89) en los sujetos expuestos a letrozol prenatal (como ya lo habíamos reportado en estudios previos, Olvera-Hernández et al., 2015; Hernández & Fernández-Guasti, 2018) y en el grupo de machos con la combinación de tratamientos (LQ de 85) comparado con el grupo que solamente se sometió a estrés (LQ de 40) (ANOVA Kruskal Wallis; $H(2)=9.06$; $p=0.005$). Al comparar la combinación (estrés y letrozol) con el grupo de estrés se encontró una tendencia a que el cociente de lordosis fuera mayor que no resultó estadísticamente significativa (U de Mann Whitney, $p=0.056$).

Conducta sexual							
	Masculina					Femenina	
	% de machos que montan	Media de montas	% de machos que intromiten	Media de intromisiones	% de machos que eyaculan	% de lordosis	Cociente de lordosis
Control	19/21 90%	18	17/21 81%	11	9/21 43%	0/21 0%	--
LET	23/30 77%	14	20/30 67%	9	5/30 17%	10/30 33%**	89
Estrés	12/16 75%	7**	7/16 44%*	3***	0/16 0%**	4/16 25%*	40***
Estrés+LET	12/17 70%	7** ***	5/17 29%**	4** *	0/17 0%**	6/17 35%**	85 ⁺

Tabla 6. Conducta sexual masculina y femenina de machos tratados prenatalmente con letrozol, estrés prenatal y con la combinación de tratamientos. Las proporciones se analizaron con la prueba exacta de Fisher, $*p<0.05$; $**p<0.01$ vs. control; $\&p<0.05$ vs. LET. El número de eventos y el cociente de lordosis se analizaron con un ANOVA Kruskal Wallis seguido de U de Mann Whitney $*p<0.05$; $**p<0.01$; $***p<0.001$ vs. control; $\&p<0.05$; $\&\&p<0.001$ vs. LET; $+p=0.056$ vs. estrés.

8.2 Áreas cerebrales y preferencia sexual

8.2.1 Determinación de la actividad cerebral ante la presencia de un estímulo mediante la cuantificación de c-Fos

Para obtener animales con preferencia por el macho, se trató a hembras gestantes con letrozol (Olvera-Hernández et al., 2015; Hernández & Fernández-Guasti, 2018). Una vez realizada la prueba de preferencia se obtuvieron dos poblaciones: una que interactuó más tiempo con la hembra sexualmente receptiva y otra que invierte más tiempo interactuando con el macho sexualmente experto. Se analizó el tiempo de interacción con los estímulos y se encontraron diferencias entre los grupos (Figura 18, ANOVA de una vía $F_{(2,27)}=10.14$; $p<0.001$, pos hoc Tukey). Los machos con preferencia por el macho pasaron menos tiempo interactuando con la hembra sexualmente receptiva ($p=0.003$) y más tiempo con el macho sexualmente experto ($p=0.02$). Una vez obtenidos, cinco animales de cada grupo se colocaron frente a un macho sexualmente experto sin permitir el contacto directo entre los sujetos. Para determinar la especificidad de la marca por c-Fos frente al estímulo (macho sexualmente experto) se añadieron grupos de animales control con diferentes preferencias sexuales, expuestos a la prueba, pero sin la presencia del estímulo.

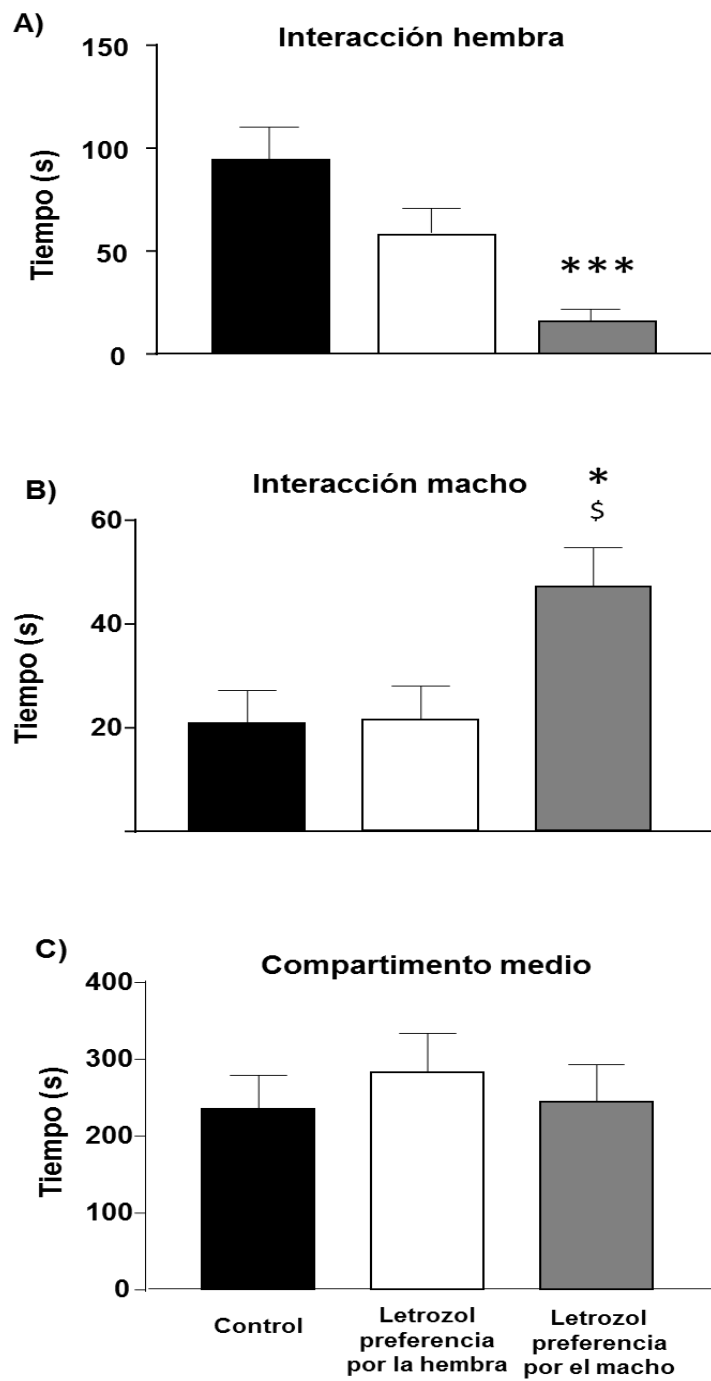


Figura 18. Tiempo de interacción con los estímulos en la prueba de preferencia en machos nacidos de hembras tratadas con letrozol y con distinta preferencia sexual. ANOVA de una vía *pos hoc* Tukey * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$ vs. control; \$ $p \leq 0.05$, vs letrozol preferencia por la hembra.

8.2.1.1 Inmunoreactividad a c-Fos ante la exposición al estímulo

Al analizar el número de IR-Fos en el área preóptica (MPOA) (figura 19, panel izquierdo) el análisis de varianza de 2 vías mostró un efecto de la exposición al estímulo ($F_{(1,299)}=6.15$, $p=0.013$), del tratamiento prenatal/preferencia ($F_{(2,299)}=5.83$, $p=0.03$) y una interacción entre los factores ($F_{(2,299)}=10.06$, $p<0.001$). Entre los grupos de machos con preferencia por la hembra no se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando fueron expuestos al estímulo (barras grises) y sus respectivos controles (barras punteadas, sin exposición al estímulo). Sin embargo, de manera interesante, hubo un incremento significativo en la expresión de c-Fos en esta región cerebral, únicamente en el grupo de machos con preferencia por el macho ante la presencia del estímulo ($p<0.001$).

En el VMH aunque no se encontró un efecto debido a la exposición del estímulo ($F_{(1,237)}=0.11$, $p=0.07$) sí lo hubo en la preferencia/tratamiento ($F_{(2,237)}=3.52$, $p=0.03$) y una interacción entre los factores ($F_{(2,237)}=5.75$, $p=0.003$). Únicamente se encontró un incremento en la expresión de c-Fos en esa estructura ante la presencia del estímulo en el grupo de machos control con preferencia por la hembra ($p=0.03$).

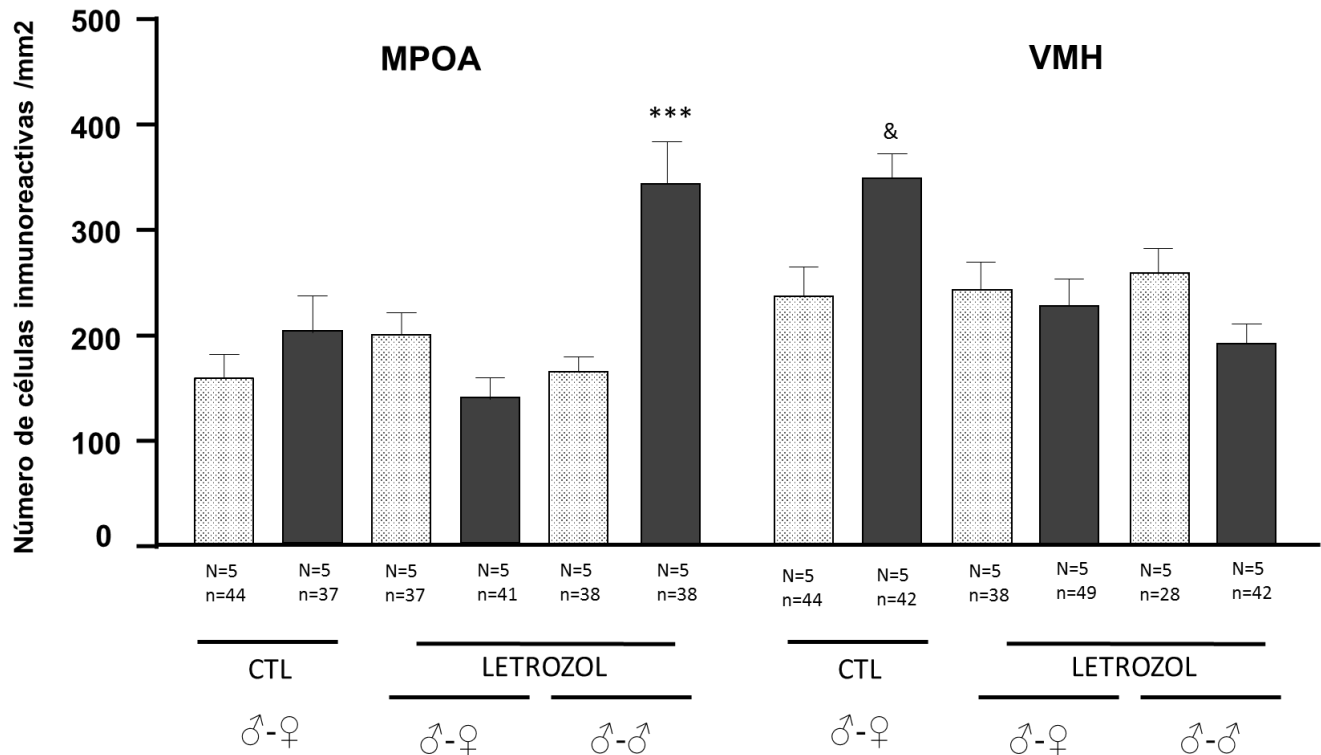


Figura 19. Número de células inmunoreactivas a c-Fos en el MPOA o en VMH de machos que no se expusieron al estímulo (barras punteadas) y ante la presencia de un macho sexualmente experto (barras grises). ANOVA de dos vías pos hoc Tukey. * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$ vs. mismo grupo sin estímulo. N=número de animales; n=número de tejidos contados.

Como se revisó en la introducción, algunos autores han sugerido que la amígdala podría participar en la preferencia sexual ya que se ha encontrado una actividad diferencial en esta estructura dependiendo de la preferencia sexual (Coria et al., 2018). Nuestros resultados en la amígdala medial posterodorsal (Figura 20, panel izquierdo) muestran que a pesar de que la interacción entre los factores (tratamiento/preferencia y exposición al estímulo) no fue significativo, se encuentra muy cerca de la significancia ($F_{(2,216)}=2.93$, $p=0.055$), eso se debe a que existe un efecto de la exposición ($F_{(1,216)}=24.7$, $p<0.001$) y del tratamiento/preferencia $F_{(2,216)}=5.89$, $p=0.003$). El análisis de la gráfica muestra un incremento en la expresión de c-Fos en los grupos de machos con preferencia por la hembra ya sea el control

($p=0.05$) o tratados con letrozol ($p=0.005$) cuando se exponen al macho sexualmente experto. Interesantemente este incremento no se observó en el grupo de machos con preferencia por sujetos de su mismo sexo ($p=0.94$).

Por otro lado, la actividad de c-Fos en la amígdala basolateral (figura 20, panel central) no cambió significativamente ante la presencia del estímulo ($F_{(1,237)}=0.25$, $p=0.06$) y no se encontró ninguna diferencia significativa entre preferencias/tratamientos ($F_{(2,237)}=0.04$, $p=0.95$). Resulta interesante que a pesar de que no hay diferencias significativas, en el grupo de machos con preferencia por el macho, hubo una tendencia ($p=0.058$) a una expresión mayor de c-Fos ante el estímulo.

Cuando se midió la IR-Fos en el núcleo accumbens (Figura 20) no se encontraron diferencias significativas en el factor tratamiento/preferencia (aunque el valor se encuentra muy cerca de la significancia estadística, $F_{(1,259)}=3.79$, $p=0.052$). El factor preferencia/tratamiento sí muestra un efecto ($F_{(2,259)}=3.32$, $p=0.03$) y también hubo una interacción entre los factores ($F_{(2,259)}=6.34$, $p=0.002$). El número de células inmunoreactivas entre los grupos con preferencia por la hembra no varió cuando los animales fueron expuestos al estímulo. Sin embargo, sólo en el grupo de machos con preferencia por el macho se encontró un incremento significativo en la expresión cuando se presentó un macho sexualmente experto ($p=0.04$). Cabe aclarar que en el control de este grupo de animales (con preferencia al macho, pero no expuesto al estímulo) se observó una reducción en el número de células IR-Fos comparado con los valores de los grupos con preferencia por la hembra.

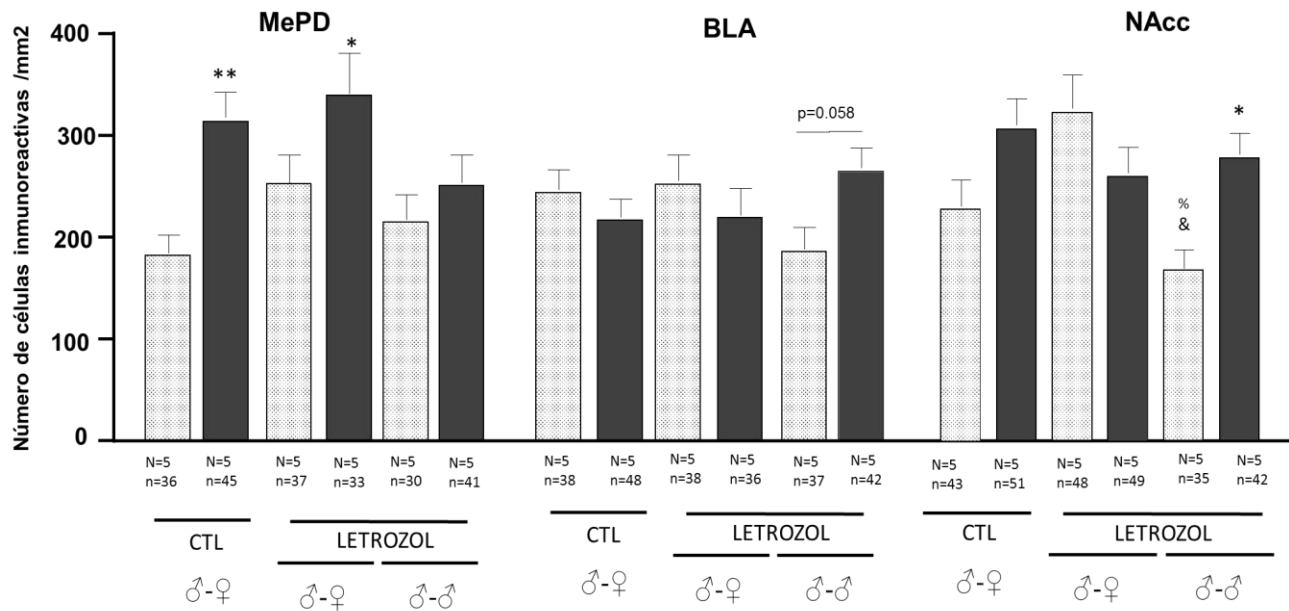


Figura 20. Número de células inmunoreactivas a c-Fos en el MePD, BLA y NAcc de machos que no se expusieron al estímulo (barras punteadas) y ante la presencia de un macho sexualmente experto (barras grises). ANOVA de dos vías pos hoc Tukey. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ vs. mismo grupo sin estímulo; % $p \leq 0.05$ vs. letrozol preferencia por la hembra; & $p \leq 0.05$ vs. control sin estímulo.

En la corteza anterior del cíngulo se encontró un efecto de la exposición al estímulo ($F_{(1,295)} = 8.16$, $p = 0.004$) y del tratamiento/preferencia $F_{(2,295)} = 4.05$, $p = 0.01$) sin que se encontrara una interacción (Figura 21, panel izquierdo). No se encontraron diferencias en la expresión de c-Fos frente al estímulo, en comparación con la ausencia del mismo, en los grupos de machos con preferencia por la hembra; sin embargo, se encontró una mayor expresión de c-Fos en el grupo de animales con preferencia por sujetos de su mismo sexo cuando se encontraron frente al macho sexualmente experto ($p = 0.03$).

Con base en este hallazgo se decidió analizar otras cortezas y se encontró que la expresión de c-Fos en la corteza prelímbica no aumentó después de la exposición al estímulo ($F_{(1,283)} = 0.59$, $p = 0.44$); sin embargo sí hubo un efecto en el factor

tratamiento/preferencia ($F_{(2,283)} = 07.69$, $p = 0.006$), posiblemente debido a que en los animales control hubo un incremento ante la presencia del estímulo ($p = 0.006$). Esta diferencia, sin embargo, se pierde en los animales tratados con letrozol, independientemente de su preferencia sexual (Figura 21, panel central).

Al evaluar c-Fos en la corteza infralímbica no se encontró que la exposición al estímulo modificara la cantidad de células IR-Fos en ninguno de los grupos, aunque, de manera basal, es decir, sin estímulo, en el grupo de machos tratados con letrozol y con preferencia por el macho hubo un incremento comparado con el grupo de machos del grupo de letrozol pero con preferencia por la hembra ($p < 0.001$). La tabla 7 resume los resultados obtenidos del presente objetivo.

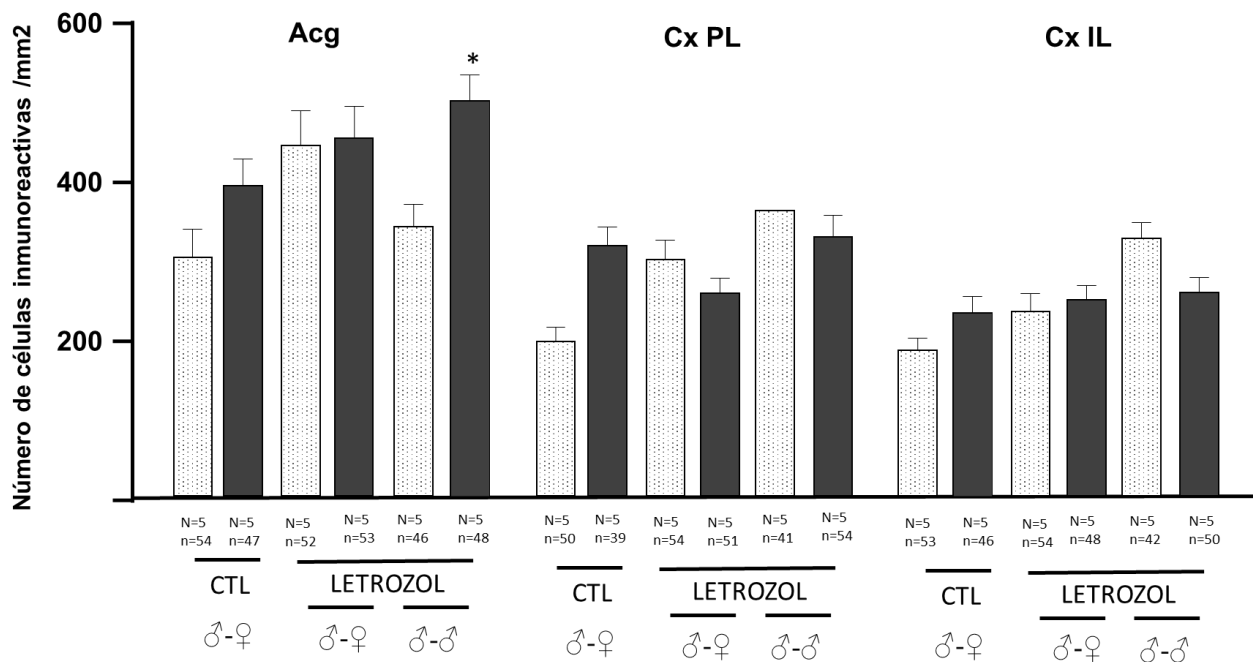


Figura 21. Número de células inmunoreactivas a c-Fos en las cortezas del cíngulo anterior, prelímbica e infralímbica de machos que no se expusieron al estímulo (barras punteadas) y ante la presencia de un macho sexualmente experto (barras grises). ANOVA de dos vías (ver texto), seguido de pos hoc Tukey, * $p < 0.05$; vs. mismo grupo sin estímulo.

	No cambia la actividad	Cambia la actividad en los machos que prefieren a la hembra	Cambia la actividad en los machos que prefieren al macho
MPOA			✓
VMH	✓		
MePD		✓	
BLA	✓		
NAcc			✓
Acg			✓
Cx PL	✓		
Cx IL	✓		

Tabla 7. Resumen de resultados de la activación de las áreas cerebrales dependiendo de la preferencia sexual

CAPÍTULO 9

9 Discusión

9.1 Posibles factores que determinan la preferencia sexual

9.1.1 Gestaciones consecutivas y administración prenatal de letrozol: efecto sobre la preferencia sexual de la progenie masculina.

9.1.1.1 Preferencia sexual

El resultado principal de esta primera parte de la tesis fue que se encontró una mayor proporción de machos con preferencia por individuos de su mismo sexo en animales con varios hermanos mayores, es decir, nacidos de hembras multíparas. Este resultado muestra, por primera vez, un posible efecto del orden de nacimiento en roedores, y va en línea con lo que hasta ahora ha sido reportado en humanos de manera consistente (Bogaert & Skorska, 2011; Skorska & Bogaert, 2020; Blanchard & Bogaert, 1996).

Se podría argumentar que la alta proporción de machos con preferencia por sujetos de su mismo sexo puede deberse a un efecto camada (Jensh et al., 1970), es decir, que el resultado observado se deba a un efecto particular en alguna camada y no a la multiparidad. El análisis de la conformación de las camadas y el número de sujetos con preferencia por otros de su mismo sexo sugieren que no se trata de un efecto camada, ya que el grupo de sujetos con esta preferencia se formó con individuos provenientes de diferentes camadas que se distribuyeron aleatoriamente, sin importar el número de hermanos en esa o en las camadas anteriores. Aunado a esto, en ninguna de las camadas se dio el caso de que todos los machos tuvieran preferencia por otro macho.

Cuando se buscó una relación entre el índice de preferencia y el número de partos previos de la madre se encontró una correlación negativa entre ambas, lo cual indica que en el grupo de machos nacidos de madres multíparas hay más animales con preferencia por el macho; sin embargo, esa correlación se pierde cuando se considera únicamente a los animales nacidos de hembras multíparas, es decir con 4, 5 ó 6 partos. Lo anterior sugiere que una vez que el efecto de orden de nacimiento se establece, la proporción de machos que prefieren a su mismo sexo se mantiene, independientemente de cuantos partos previos haya tenido la madre. Con los datos hasta ahora obtenidos, no es posible conocer en qué momento se establece ese cambio en la preferencia en la progenie, y futuros trabajos deberían realizarse para buscar qué ocurre en las gestaciones que no fueron consideradas en este trabajo (2 y 3 gestaciones previas). El número de gestaciones previas que se estableció (4 mínimo) fue para asegurar que las hembras se hubieran mantenido expuestas de manera recurrente a fetos del sexo masculino. En este caso, los machos utilizados tienen un promedio de 18 hermanos mayores.

El incremento en la proporción de machos con preferencia por sujetos de su mismo sexo debe ser interpretado cuidadosamente, sobre todo al compararse con lo encontrado en humanos, debido a que las condiciones de la gestación varían mucho de una especie a otra. En el caso de los roedores suelen tener camadas grandes (10-15 crías) mitad hembras y mitad machos (Rosenfeld & Roberts, 2004), mientras que en los humanos usualmente nace un hijo por gestación y los varones homosexuales suelen tener uno o dos hermanos mayores (Bogaert & Skorska, 2011). Lo anterior abre la pregunta acerca de si el efecto de orden de nacimientos está ligado al número de hermanos mayores o bien, específicamente a la condición

de multiparidad de la madre. Experimentos futuros deben orientarse a responder esta interrogante.

Otro de los factores que podría afectar los resultados obtenidos fue la edad de la madre ya que las hembras multíparas tienen una edad de 12 meses aproximadamente y a esta edad existe una disminución en la fertilidad y en el tamaño de las camadas (Care et al., 2015; Day et al., 1989), lo que podría estar causando los efectos conductuales que se observaron en la progenie. Esa posibilidad se descartó debido a que no se encontraron diferencias en la proporción de machos con preferencia por otro macho entre aquellos nacidos de madres primíparas jóvenes y primíparas envejecidas, aunado a esto, tampoco se encontraron diferencias en la expresión de la conducta sexual entre esos grupos. Sin embargo, los parámetros antes mencionados, sí difieren de los encontrados en machos nacidos de hembras multíparas.

Tal como se ha sugerido, el efecto del orden de nacimiento puede estar relacionado con factores inmunológicos durante el periodo de organización cerebral (Bogaert & Skorska, 2011; Skorska & Bogaert 2020; Bogaert et al., 2018) y es posible que sea la explicación del fenómeno observado en este trabajo. Esta hipótesis propone que ante la continua exposición de la madre a fetos del sexo masculino, ésta desarrolla una respuesta inmune que puede estar mediada por la producción de anticuerpos específicos, liberación de citocinas o bien, una respuesta inmune desconocida. Esa respuesta tendría como consecuencia un cambio en el proceso de diferenciación sexual cerebral e induciría cambios observables en la progenie cuando adultos (Bogaert & Skorska, 2011; Blanchard & Bogaert, 1996). En apoyo a esta hipótesis, se ha encontrado que la inflamación materna durante la gestación aumenta las

citocinas proinflamatorias fetales, este incremento a su vez, se asocia con una mayor densidad de astrocitos; sin embargo, el aumento sólo se presenta en una proporción de animales nacidos de hembras con activación inmune materna (Cai et al., 2000). Lo anterior podría explicar, en parte, por qué sólo una proporción de animales nacidos de hembras multíparas muestran preferencia por su mismo sexo. En relación con la posible producción de un anticuerpo contra una proteína producida por el cromosoma Y, un estudio reciente encontró un aumento en la presencia de un anticuerpo contra la proteína NLGN4Y en madres de varones homosexuales (Bogaert et al., 2018). Esta proteína está relacionada con la comunicación celular y la formación de sinapsis durante el desarrollo y se sugiere que podría estar relacionada con el establecimiento de la preferencia sexual (Bogaert et al., 2018). La proteína NLGN4Y no está presente en los roedores (Reinius & Jazin, 2009); no obstante, en estas especies existen varias neuroliginas que tienen una estructura similar a NLGN4Y (Bemben et al., 2014) y pudieran estar participando en la determinación de la preferencia sexual, sin embargo, se debe considerar que otros factores adicionales podrían estar involucrados.

9.1.1.2 Conducta sexual

El proceso de masculinización y desfeminización durante el desarrollo perinatal es importante para que se determinen las conductas sexualmente dimórficas (Henley et al., 2011). En los machos nacidos de hembras multíparas se encontró una disminución en el tiempo de interacción con la hembra sexualmente receptiva que indica un proceso de virilización afectado, así como un incremento en las conductas proceptivas, que estaría asociado a una alteración en la desfeminización. Dentro de

esta población (animales nacidos de hembras múltiparas), los machos que tienen preferencia por el macho, además de lo anterior, presentan una disminución en la ejecución de la conducta sexual masculina (ninguno eyaculó) y un aumento en la conducta sexual femenina (proceptividad y lordosis) indicando que en ellos el proceso de masculinización y desfeminización sufrió un cambio más drástico. En esta población, en la caja de tres compartimentos, también se encontró un aumento significativo en el porcentaje de machos que recibieron montas del macho experto, lo que sugiere que el animal podría ser más atractivo para el macho estímulo y estar más dispuesto a recibir esas montas, aunque también se ha propuesto que la conducta de monta hacia otros machos tiene un componente social y de dominancia (Grant, 1963). Sin embargo, estos machos (nacidos de hembras múltiparas y con preferencia por el macho) presentaron conductas proceptivas que podrían haber provocado el alto número de montas por parte del macho estímulo. El posible mecanismo mediante el cual se están produciendo los cambios en la virilización y en la desfeminización es desconocido; sin embargo, como se mencionó anteriormente, se ha sugerido que las citocinas, las células cebadas y moléculas inmunológicas participan en el proceso de diferenciación sexual cerebral. Por ejemplo, se sabe que la PGE2 es necesaria para el proceso de masculinización del MPOA, una estructura clave para la ejecución de la conducta sexual (Amateau & McCarthy, 2004). Aunado a esto, la inhibición de las células cebadas con ketotifeno altera el proceso de masculinización en roedores (Lenz et al., 2018). Naturalmente falta analizar muchos otros posibles mecanismos, como la inflamación.

Respecto a la combinación de los factores endócrinos y de multiparidad existen diversas causales asociadas a la inviabilidad aquí observada para explorar esta

interacción que incluyen la edad de la madre, gestaciones previas e incluso la dosis de letrozol utilizada. Nuevos experimentos deben ser realizados para poder probar cada una de ellas.

9.1.2 Interacción entre el estrés de la madre y la administración prenatal de letrozol en la preferencia sexual de ratas macho en la etapa adulta.

9.1.2.1 Preferencia sexual

La premisa principal de ese objetivo fue que la administración prenatal de letrozol simultánea a un protocolo de estrés durante la gestación induciría un incremento en la proporción de machos con preferencia hacia sujetos de su mismo sexo, generando una interacción entre ambos tratamientos; sin embargo, después de los tratamientos dados de manera simultánea no se encontró un incremento significativo en el porcentaje de machos que prefiere a individuos de su mismo sexo.

La primera observación fue que los tratamientos aplicados por separado incrementaron la proporción de machos con preferencia por sujetos de su mismo sexo a niveles similares a los que ya se habían reportado tras la inyección prenatal de letrozol (Olvera-Hernández et al., 2015; Hernández & Fernández-Guasti, 2018) o después de aplicar estrés prenatal con diferentes estresores y pruebas de preferencia (Meek et al., 2006; Marchlewska-Koj et al., 2003). Particularmente, Meek y colaboradores en 2006 obtuvo resultados similares realizando un protocolo similar al aquí presentado, en este caso el estresor y la especie utilizada fue distinta (ratón) aunque también se utilizó la prueba de preferencia sexual de tres

compartimentos. Adicionalmente a los efectos en la preferencia sexual se ha indicado que el estrés gestacional induce alteraciones en habilidades cognitivas (Kim et al., 2015; Charil et al., 2010), particularmente en la sociabilidad (Patin et al., 2005). De manera interesante, encontramos que algunos machos nacidos de hembras estresadas no interactuaron con ninguno de los estímulos y permanecieron todo el tiempo en el mismo compartimento. Adicionalmente, ambos grupos de machos nacidos de hembras estresadas (estrés solo o en combinación) el tiempo de interacción con el estímulo preferido disminuyó. Además, se encontró que en algunos machos cuyas madres fueron estresadas, la sociabilidad se redujo, de tal manera que los animales se descartaron y su preferencia sexual no pudo determinarse, ya que estos animales no abandonaron el compartimento medio, estos hallazgos se encuentran en línea con los estudios previos que reportan una disminución en la sociabilidad en animales cuyas madres fueron estresadas durante la gestación (Patin et al., 2005).

9.1.2.2 Conducta sexual

Cuando se colocó a los machos nacidos de hembras estresadas frente a una hembra sexualmente receptiva se encontró una menor proporción de machos que intromitieron y eyacularon, además de que el número de montas e intromisiones también disminuyó. Lo anterior indica una alteración en el proceso de masculinización (Nugent et al., 2015). En contraparte, cuando los machos fueron probados con un macho sexualmente experto hubo un incremento en el porcentaje de machos que realizó la conducta de lordosis, indicando que el proceso de desfeminización también se vio alterado (Henley et al., 2011). Este resultado

coincide con lo encontrado en protocolos previos usando diferentes estresores (Meek et al., 2006; Marchlewska-Koj et al., 2003) y refuerza la idea de que el estrés altera el proceso de masculinización y desfeminización. Cuando se realizó la administración de letrozol simultánea al protocolo de estrés prenatal, de manera similar se encontró un aumento de la conducta sexual femenina (asociado al tratamiento de letrozol) y disminuyó la conducta sexual masculina (principalmente debido al estrés). En la prueba de tres compartimentos en el grupo de la combinación se encontró una disminución en el número de machos que realizaron montas (hacia el macho sexualmente experto o hacia la hembra receptiva) e intromisiones. Cabe aclarar que la expresión de la conducta sexual en la prueba de preferencia y en la arena de conducta sexual no siempre es similar, por ejemplo, en la prueba de tres compartimentos encontramos una alta proporción de animales que recibieron montas del macho sexualmente experto (lo que sugiere un aumento en la atractividad del macho experimental); sin embargo, en la prueba de conducta sexual con el macho sexualmente experto no se encontró el mismo resultado. Estas diferencias podrían estar asociadas a las diferencias que existen entre ambos paradigmas (Olvera-Hernández et al., 2019).

9.1.2.3 Ausencia de interacción entre la administración de letrozol y estrés prenatal con la preferencia sexual

En ninguno de los parámetros de la prueba de preferencia se encontraron resultados diferentes a los obtenidos tras los tratamientos dados de manera separada, indicando una falta de interacción. De manera interesante, en algunos parámetros, el efecto de un factor prevalece en la combinación de tratamientos. Por

ejemplo, en ambos grupos con estrés hubo una disminución en el tiempo de interacción con el estímulo preferido, con lo que se podría proponer que el estrés disminuye la motivación para interactuar socialmente. Estudios previos evaluaron la motivación sexual de machos estresados prenatalmente y se encontró una reducción en el tiempo que los machos visitaron a la hembra, sin un aumento en el tiempo de visita al macho, sugiriendo una alteración en la masculinización, pero no una feminización de la motivación sexual (Wang et al., 2006).

Los mecanismos que dan lugar a la disminución en la motivación a interactuar sexual o socialmente se desconocen, pero se ha encontrado que la progenie de hembras estresadas presenta una alteración en la sociabilidad (reducción de la memoria social y la interacción) asociada a la disminución de neuronas oxitocinérgicas y vasopresinérgicas (De Souza et al., 2013; Lee et al., 2007).

Previamente se ha demostrado que la administración prenatal de letrozol incrementa las erecciones sin contacto en machos que tienen preferencia por otros cuando se exponen (sin poder interactuar) a un macho sexualmente experto, lo que es un indicador de un incremento de la motivación sexual (Olvera-Hernández et al., 2015). Considerando lo anterior, sería interesante evaluar si la combinación de estrés y letrozol altera la motivación sexual en este y otros paradigmas distintos (Agmo, 2003; Hurtazo et al., 2008).

Una de las posibles causas de la falta de interacción entre el estrés prenatal y el letrozol podría ser que se alcanzara un “efecto techo o piso”; que ocurren cuando una cantidad considerable de sujetos obtiene la máxima/mínima puntuación en una escala, volviendo la medida incapaz de discriminar entre sujetos o extremos (Lim et al., 2015). Contrario a esa idea, se observó que el cambio en la preferencia inducido

por los tratamientos de manera separada fue de un 30 a 40 % de machos con preferencia hacia su mismo sexo, lo cual deja una ventana muy amplia para observar probables interacciones entre estrés y letrozol. Lo mismo ocurre en la evaluación de la conducta sexual, dentro y fuera de la prueba de preferencia, con el porcentaje de montas, intromisiones y eyaculaciones. En el grupo de animales estresados ninguno eyaculó y en los grupos con letrozol, los valores de lordosis son cercanos al máximo y en estos casos el efecto piso/techo podría estar velando las posibles interacciones.

Como se mencionó anteriormente, el estrés prenatal interfiere con el desarrollo de las células de Leydig, alterando tanto los niveles de testosterona durante los días gestacionales 17 a 19 (Weisz & Ward, 1980) como la actividad de la aromatasa durante los días gestacionales 18 y 19 (Weisz et al., 1982). Lo anterior se traduce en una disminución en la cantidad de estradiol formado en el cerebro en desarrollo, esencial para el proceso de diferenciación sexual (McCarthy, 2008; 2009). Nuestros resultados y lo anteriormente mencionado sugieren una vía endocrina en común en los efectos del estrés prenatal y evidentemente de la administración de letrozol: inhibidor de la aromatización. Parece ser que la inhibición de la síntesis de estrógenos prenatal inducida de manera farmacológica -por la administración de letrozol- no se suma a la ya producida por el estrés. Esta observación sugiere que la inhibición de la aromatasa independientemente de lo que la induzca (estrés o letrozol) sólo afecta a la mitad de los animales ya que, como se observó anteriormente, dosis más altas de letrozol o tratamientos más prolongados no incrementan la proporción de machos con preferencia por individuos de su mismo sexo (Olvera-Hernández et al., 2015; 2019). No obstante, otras características de la

especie, como la capacidad de gestar múltiples crías a la vez, en donde los niveles de andrógenos pueden ser distintos dependiendo de la posición en el útero (McLaurin & Mactutus, 2015; Vom Saal, 1981; Pei et al., 2006) podrían explicar la variabilidad observada en la preferencia sexual de las camadas de los diferentes grupos.

Se sabe que el estrés prenatal induce cambios conductuales importantes, que incluyen una disminución en la desfeminización, la masculinización y la sociabilidad (Weinstock, 2007; Weisz & Ward, 1980; Weisz et al., 1982; Takahashi et al., 1992), reforzando la idea de que el estrés altera muchos mecanismos asociados al proceso de diferenciación cerebral (Ward, 1972; Patin et al., 2005). Por lo que, además de la inhibición de aromatasa producida por el estrés, pueden existir muchos otros mecanismos involucrados cuando se combina con letrozol.

Durante el desarrollo, el sistema monoaminérgico parece regular la actividad de la aromatasa en estructuras cerebrales específicas, particularmente en aquellas relacionadas con la conducta sexual (Balthazart & Ball, 1998). Además, las catecolaminas disminuyen la actividad de la aromatasa *in vitro* actuando como sustrato y compitiendo con la testosterona, disminuyendo la producción de estradiol (Jimbo et al., 1998; Balthazart et al., 2002). Aunado a lo anterior, se encontró que el estrés prenatal reduce la actividad de la aromatasa en el área preóptica (MPOA), estructura de importancia vital en el desarrollo de la preferencia y la conducta sexual (Bakker et al., 1996b; Hull & Rodríguez-Manzo, 2009), y que esto elimina las diferencias sexuales en los niveles de catecolaminas, particularmente dopamina, lo cual está mediado por una disminución en los niveles de estrógenos (Simerly et al., 1985; 1997). Con lo anterior, se plantea la posibilidad de que la preferencia sexual

esté mediada también por aminas biogénicas que se expresan de manera diferente en esta estructura cerebral.

Respecto a las monoaminas, específicamente la serotonina, existe evidencia (Liu et al., 2011), aunque controversial (Angoa-Pérez et al., 2015), de su participación en la preferencia sexual ya que, ratones *knockout* a la enzima responsable de la síntesis de serotonina, triptofano hidroxilasa (Tph2^{-/-}), muestran un incremento en la conducta sexual y en preferencia sexual hacia otros machos, señalando otra posible vía de determinación de la preferencia sexual que futuros estudios deben considerar.

9.1.3 Multiparidad, estrés y letrozol

Es posible que una de las razones por las cuales no se encontró la interacción entre los factores esperada, sea que el mecanismo mediante el cual se está ejerciendo el cambio en la preferencia sexual sea común para los tres. En este sentido, se propone que el mecanismo mediante el cual el letrozol induce los cambios en la preferencia sexual de la progenie es a través de la inhibición de la aromatasa durante ventanas del desarrollo cerebral específicas. Del mismo modo, se sabe que el estrés durante la gestación inhibe los niveles de aromatasa durante días que son esenciales para el proceso de diferenciación cerebral (Weisz et al., 1982; McCarthy, 2008; 2009). Finalmente, se sabe que la exposición a estresores perturba la homeostasis de las constantes fisiológicas incluyendo un aumento en la susceptibilidad y evolución de enfermedades infecciosas a través de la disminución del sistema inmune (Gómez & Escobar, 2006). Ante un estresor agudo o constante el eje hipotálamo hipófisis adrenal a través de glucocorticoides y neurotransmisores

en el intento por restablecer la homeostasis, inhibe el funcionamiento de sistemas con mayor gasto energético, como el sistema inmune. Estas moléculas, son capaces de ejercer una influencia directa en el funcionamiento de las células inmunes a través de receptores específicos (Glaser & Kiecolt-Glaser, 2005).

Adicionalmente, se sabe que los efectos del estrés en el sistema inmune no solamente se dan cuando el estresor ocurre durante la etapa adulta, sino que incluso los efectos ocurren si el estresor se presenta en la etapa perinatal y los efectos pueden ser observados desde los 2 meses de edad (Kay et al., 1998).

Aunado a la posible relación entre el estrés prenatal y la actividad del sistema inmune, se encuentra el papel de la betametasona, un corticosteroide sintético. Experimentalmente, se sabe que la administración prenatal de betametasona disminuye, cuando adultos, algunos parámetros testiculares, adicionalmente a la reducción de los niveles de testosterona y fertilidad (Piffer et al., 2009). De manera interesante, al evaluar la preferencia sexual de animales tratados prenatalmente con betametasona, se encontró alteración de la conducta sexual, y tras la administración de estrógenos, un incremento significativo en el porcentaje de machos que realizaron lordosis y recibieron montas del macho.

9.2 Áreas cerebrales y preferencia sexual

9.2.1 Determinación de la actividad cerebral mediante la cuantificación de c-Fos

La última parte del presente trabajo estuvo orientada a la evaluación de la actividad cerebral de los machos ante la presencia de un macho sexualmente experto, con el fin de analizar si existe una activación diferencial dependiente de la preferencia sexual. Los estudios con c-Fos tienen la desventaja de que la inmunoreactividad se

produce por una variedad de estímulos. Por ello incluimos tres grupos control en los que los sujetos (con preferencia por la hembra o por el macho) no fueron expuestos al estímulo, es decir al macho sexualmente experto. Esa activación (que podríamos llamar "basal") sirvió de base para analizar la activación/inhibición que producía la exposición al estímulo. Además, dado que los machos tuvieron que recibir letrozol prenatal para mostrar preferencia sexual por sujetos de su mismo sexo, incluimos otro grupo de animales con preferencia por la hembra y que también recibió letrozol prenatal con el fin de analizar si los cambios en la inmunoreactividad del primer grupo se debían a la exposición a letrozol prenatal. En esta discusión hablaremos fundamentalmente de la activación diferencial dependiente de la exposición al estímulo (macho sexualmente experto) entre los tres diferentes grupos (animales control tratados con vehículo y con preferencia por la hembra, animales control tratados con letrozol y con preferencia por la hembra y animales experimentales tratados con letrozol y con preferencia por el macho).

De manera interesante, se encontró un incremento en la actividad cerebral en el MPOA en el grupo de machos que mostraron preferencia por el macho, cuando se les presentó al macho sexualmente experto. Estos resultados coinciden con lo encontrado en estudios previos en animales con preferencia por sujetos de su mismo sexo inducida por la administración de otro inhibidor de aromatasa, ATD (Bakker et al., 1996b). Además, estos resultados apoyan las observaciones en humanos que señalan que tanto el volumen (Swaab & Hofman, 1990; LeVay, 1991; Allen & Gorski, 1992) como la actividad (Savic et al., 2005; Safron et al., 2007) de esta estructura es distinta en varones homosexuales. Lo anterior reafirma la idea de la participación de esta estructura en la preferencia sexual. Los resultados de esta

tesis muestran que, en el MPOA de machos con preferencia sexual por sujetos de su mismo sexo, la exposición a un macho estímulo provocó una importante activación neuronal. Esta activación ocurrió sólo en animales con preferencia por sujetos de su mismo sexo y no en sujetos control (con preferencia por la hembra) o en machos prenatalmente tratados con letrozol que prefirieron a la hembra; es decir, parece depender sólo de la preferencia sexual y no de la administración prenatal de letrozol. Este resultado concuerda con la vasta evidencia que señala que el MPOA juega un papel muy importante en el control neural de la preferencia sexual (Coolen et al., 1996; 1997; Paredes, 2003; Robertson et al., 1991; Hurtazo & Paredes, 2005; Bakker, 1996b; Baum & Everitt, 1992) y que se puede activar ante estímulos que denotan la motivación sexual (Paredes, 2003; Pfaus et al., 1990). En relación con este último punto es importante señalar que, en machos con preferencia por la hembra, la sola exposición a una hembra sexualmente receptiva no provoca la activación de esta estructura cerebral medida por c-Fos (Coolen, 1996; 1997; Yamaguchi et al., 2018). Sin embargo, cómo ya se mencionó en la Introducción (Bakker et al., 1996b), en los machos tratados perinatalmente con el inhibidor de aromatasa ATD, que tenían preferencia sexual por otros machos, ocurre una activación de MPOA, medida por la expresión de c-Fos, cuando los animales se expusieron a aserrín de otros machos sexualmente activos, a pesar de que no existió interacción física con el sujeto estímulo. Esta activación presentó 3 características relevantes: (1) sólo ocurrió en las partes centrales de la vía vomeronasal (MPOA y BNST) y no en las partes periféricas de esta misma vía (la porción accesoria del bulbo olfatorio y la amígdala medial), (2) sólo ocurrió en los animales tratados con el inhibidor de aromatasa y no se presentó en los animales control (tratados con el vehículo de ATD y que prefieren a la hembra) y (3) fue

similar a aquélla que ocurrió en hembras sexualmente receptivas que también mostraron preferencia olfativa por estímulos del macho. Los resultados obtenidos en la presente tesis están en línea con esta observación, ya que la exposición a un macho sexualmente activo produjo una activación exclusivamente del MPOA sólo en machos con preferencia por sujetos de su mismo sexo y no en individuos con preferencia por la hembra, sugiriendo que esta estructura participa en los componentes apetitivos de la preferencia sexual. De la misma manera, en algunas estructuras de la parte periférica de la vía vomeronasal (núcleos amigdalinos, MePV, MePD) no existieron diferencias en la activación entre machos con preferencia por la hembra y aquellos con preferencia por el macho. Estos resultados sugieren que la capacidad de respuesta de las neuronas del MPOA a los estímulos (probablemente olfativos) provenientes del macho sexualmente activo se diferencia sexualmente debido a la acción neonatal de los estrógenos.

Naturalmente valdría la pena analizar si, como ocurre con machos que prefieren a la hembra, la activación neuronal del MPOA aumenta con la ejecución de la conducta sexual, es decir cuando exista interacción entre los dos machos. De esta serie de resultados surgen las preguntas: ¿por qué sólo en machos que muestran preferencia por individuos de su mismo sexo (inducida por ATD o letrozol) existe activación del MPOA por estímulos sensoriales por parte de otro macho? ¿Por qué esa activación no ocurre en machos con preferencia por la hembra bajo condiciones de ausencia de interacción física? Podría pensarse que parte de la respuesta a estas interrogantes resida en el hecho de que los sujetos con preferencia sexual por otros machos fueron tratados perinatalmente con inhibidores de aromatasa. Sin embargo, nosotros demostramos que en los machos con

preferencia por la hembra tratados prenatalmente con letrozol no existe activación del MPOA cuando los animales se expusieron a un macho estímulo. Esta observación sugiere que el efecto no se debe al tratamiento prenatal sino a la preferencia sexual.

Como se mencionó en la introducción, se ha propuesto que el MPOA integra la información olfativa con otros componentes motivacionales y ejecutorios, lo que permite el despliegue de la conducta sexual masculina. En ese sentido se ha analizado si en los animales con lesiones en esta zona cerebral se altera la preferencia olfativa y si esta lesión altera la IR-Fos del sistema olfativo accesorio que conduce señales sexualmente relevantes. Se encontró que las ratas macho control, antes de la lesión, pasaron más tiempo investigando el aserrín proveniente de cajas de hembras en estro en comparación con la de hembras en anestro y que después de la lesión, los sujetos perdieron la preferencia olfativa. Sin embargo, la exposición a olores sexualmente relevantes provocó IR-Fos tanto en animales control como lesionados en estructuras del sistema olfativo accesorio (capa granular del bulbo olfatorio accesorio, amígdala medial, amígdala medial postero-dorsal, núcleo de cama de la estría terminal), sugiriendo que el cambio en la preferencia olfativa no se asocia con alteraciones en el procesamiento de señales olfativas sexualmente relevantes por el sistema olfativo accesorio (Hurtazo & Paredes, 2005).

El núcleo del hipotálamo ventromedial (VMH) es una estructura que en el caso de las hembras se asocia a la expresión de la conducta de lordosis y la receptividad (Micevych & Meisel, 2017; Ventura-Aquino & Paredes, 2017). A pesar de que esta estructura se vincula más a la conducta sexual femenina se ha encontrado que

expresa receptores a andrógenos y recibe señales quimiosensoriales. Así, las lesiones electrolíticas en VMH alteran las vocalizaciones ultrasónicas, pero no afectan la cópula (Hull & Rodríguez-Manzo, 2009). En el VMH, parte del circuito olfativo, encontramos que sólo en sujetos control con preferencia por la hembra existió un incremento significativo en la IR-Fos cuando se expusieron a machos sexualmente expertos. En sujetos tratados con letrozol, independientemente de su preferencia sexual, no se observó este efecto. Este último resultado contrasta con lo reportado por Coria y colaboradores que señala que en machos que han desarrollado preferencia por otros machos en un esquema de aprendizaje condicionado, cuando se exponen al estímulo incondicionado que generó la preferencia sexual, ocurre una activación neuronal (medida por c-Fos) en el VMH (Coria-Avila et al., 2018) e invita a sugerir que el tratamiento prenatal con el inhibidor de aromatasa pudo haber interferido con esta activación. Por otro lado, es posible que esta área cerebral participe importantemente en el control neuroendócrino de la preferencia sexual a través de una mediación hormonal. Esta propuesta se basa en el hecho de que, como se mencionó en la introducción, la administración local de testosterona en esta estructura provocó que los animales castrados recuperaran la preferencia sexual por la hembra a niveles control (McGinnis et al., 1996; Harding & McGinnishart., 2003) y con una intensidad similar a la observada después de la inyección sistémica de la hormona. A pesar de que no existen cambios en los niveles de testosterona circulante entre machos prenatalmente tratados con vehículo y aquellos con letrozol (independientemente de su preferencia sexual) (Olvera-Hernández et al., 2015), un experimento en curso analiza si existen cambios en la expresión de receptores a andrógenos en esta

estructura cerebral en machos con diferente preferencia sexual. Esos resultados podrían explicar, al menos parcialmente, la falta de efecto observado.

En un intento por analizar otros componentes del sistema olfativo involucrados en la preferencia sexual, analizamos otras estructuras cerebrales en machos con preferencia por el macho después de su exposición a un sujeto de su mismo sexo. Además, datos de la literatura indican que en estructuras cerebrales como el núcleo de la cama de la estría terminal y la amígdala medial aumenta la actividad neuronal, medida por c-Fos, durante el periodo de investigación de la zona anogenital de la hembra, evento que precede a la cópula, es decir, antes de que se despliegue la conducta sexual masculina (Coolen et al., 1996).

La amígdala, es una estructura que usualmente se asocia al miedo (LeDoux, 2003); sin embargo, ahora se reconoce su papel en el procesamiento de las emociones, ya que modula procesos de memorias emocionales, atención selectiva a estímulos salientes emocionalmente y conductas emocionales innatas, como la conducta sexual (Phelps & LeDoux, 2005; Keshavarzi et al., 2014). A su vez, esta estructura se divide en distintos núcleos, de particular interés para la conducta reproductiva son el núcleo basolateral de la amígdala y la amígdala medial. La amígdala basolateral se relaciona con los afectos negativos y positivos para guiar una elección adecuada (Davis & Whalen, 2001), mientras que la amígdala medial juega un rol central en generar respuestas emocionales innatas ante señales químicas que provienen de las áreas olfatorias para controlar conductas defensivas y reproductivas (Keshavarzi et al., 2014). Además, se han encontrado diferencias sexuales en esta estructura (Hines et al., 1992) que se establecen incluso antes de la pubertad y que se reflejan en el incremento de sinapsis excitatorias, tamaño neuronal y densidad dendrítica en los machos (Cooke et al, 2005; Cooke, 2006).

De manera interesante, en el presente trabajo se encontró que en la MePD hubo un incremento en la actividad neuronal en sujetos con preferencia por la hembra (tratados o no prenatalmente al letrozol) cuando se expusieron al macho sexualmente activo. En los individuos con preferencia por el macho (tratados con letrozol), no existió esta activación neuronal. Esta observación invita a sugerir que la activación de esta área cerebral en los machos que prefieren a la hembra está relacionada con otros procesos como la ansiedad (Silveira et al., 1993; Fekete et al., 2009) o la agresión (Haller et al., 2018) que en ellos puede despertar el estímulo (otro macho sexualmente activo). Esta especulación se basa en la observación que indica que la exposición a estímulos aversivos provoca expresión de c-Fos en esta área cerebral (Silveira et al., 1993; Fekete et al., 2009; Haller et al., 2018). Falta analizar si en machos con preferencia por su mismo sexo, otro macho no despierta conductas tipo ansiedad, menor agresión y por lo tanto el estímulo carece de componentes aversivos. Sería interesante realizar una comparación con la actividad de c-Fos en hembras ante la presencia de un macho sexualmente experto para conocer si esta diferencia se debe a la preferencia sexual o a posibles diferencias organizacionales durante el desarrollo asociadas a la preferencia sexual (Cooke et al, 2005; Cooke, 2006).

También encontramos que en la amígdala basolateral hay una tendencia ($p=0.058$) a que la actividad de esta estructura sea mayor ante la presencia de un macho experto en el grupo de animales con preferencia por el macho. Este resultado podría indicar que el macho experto induciría un incremento en esta estructura que refleja la evaluación sobre la saliencia del estímulo en el macho tratado con letrozol y con preferencia por el macho. En apoyo a esto, se sabe que la BLA participa en la motivación sexual de la rata macho (Hernández-González et al., 2014).

En el presente estudio se encontró una activación específica en el núcleo accumbens en machos con preferencia por individuos de su mismo sexo, y no en sujetos con preferencia por la hembra, cuando se expusieron a un macho sexualmente activo. Este resultado concuerda con observaciones previas que señalan que en el núcleo accumbens ocurre una activación neuronal (también medida por c-Fos) en machos que han desarrollado preferencia por otros machos en un esquema de aprendizaje condicionado cuando se exponen al estímulo incondicionado que generó la preferencia sexual (Coria-Avila et al., 2018) o bien en machos que prefieren a otros machos por haber recibido perinatalmente ATD (Bakker et al., 1996b). Estos resultados son muy interesantes ya que indican que, en los machos con preferencia por otros machos, independientemente de la causal que la haya provocado (cambios en el medio hormonal durante el desarrollo, por ATD o letrozol, o aprendizaje condicionado), la exposición al sujeto estímulo provoca la activación de esta estructura, posiblemente denotando una acción retribuyente. En favor de esta interpretación, se ha observado que en machos que prefieren a la hembra, la exposición a estímulos olfativos provenientes de ella (Bakker et al., 1996b; Kim et al., 2015; Beny-Shefer et al., 2017) o a ella misma (Robertson et al., 1991) provoca la activación de esta zona cerebral. Cabe mencionar que en este trabajo no se realizó una distinción entre las áreas *core* y *shell* de esta estructura, futuros análisis contemplan la incorporación de esta distinción.

La corteza prefrontal es una estructura cerebral predominantemente asociada a funciones cognitivas superiores, normalmente se define de acuerdo con su citoarquitectura y conectividad. Si bien en los roedores esta estructura no está definida de la misma manera que en los primates (Kolb & Gibb, 2015; Kolb, 2007),

sí se pueden encontrar homologías entre las especies (Kolb, 2007). De manera interesante, lesiones en esta estructura producen una alteración de la conducta sexual en roedores (Davis et al., 2010). En ratas, la corteza prefrontal se divide en cíngulo anterior, prelímbica e infralímbica (Kolb & Gibb, 2015; Kolb, 2007; Uylings et al., 2003).

La corteza anterior del cíngulo es una estructura integral de la corteza prefrontal y tiene numerosas conexiones incluida la amígdala, NAcc y VTA (Schweimer & Hauber, 2005). La Acg está implicada en la toma de decisiones basada en la discriminación de estímulos visuales en base a la asociación de este estímulo con la recompensa, es decir, participa en la elección del estímulo más recompensante entre estímulos relativamente similares, una estructura “desambiguadora” (Cardinal et al., 2003; Schweimer & Hauber, 2005; Rushworth et al., 2004). Aunado a lo anterior, existen diferencias sexuales en las neuronas de la corteza prefrontal lo que sugiere una diferente organización que se refleja en diferencias en la cognición (Hajszan et al., 2007). Así, se sabe que las hembras tienen una menor arborización en la corteza prefrontal media, en esta estructura también existen receptores a estrógenos y progesterona, para corroborar la dependencia de las hormonas gonadales en esta diferencia, la gonadectomía elimina esta diferencia sexual (Kolb & Stewart, 1991; Kolb & Gibb, 2015). Adicionalmente, la administración de estrógenos mejora el desempeño cognitivo relacionado con la corteza media prefrontal en animales ovariectomizados, y los cambios de estrógenos circulantes influyen en el número total de espinas (Hajszan et al., 2007). Aunado a lo anterior, en trabajos previos en animales no se había evaluado la participación de la corteza media prefrontal en la preferencia sexual. De manera interesante, al exponer a los

machos con preferencia por el macho al estímulo, se encontró un incremento significativo en la actividad en la corteza del cíngulo anterior. Con base en este hallazgo, se podría proponer que el aumento en la actividad de esta estructura podría estar asociado con una valoración del macho experimental que tiene preferencia por individuos de su mismo sexo del macho estímulo (sexualmente experto) como un potencial compañero sexual, dado que es una estructura asociada a la evaluación de estímulos potencialmente reforzantes (Cardinal et al., 2003; Schweimer & Hauber, 2005; Rushworth et al., 2004).

Otra de las posibles explicaciones a la activación diferencial de esta estructura, se asocia con los niveles de estradiol durante el desarrollo, ya que el tratamiento de letrozol disminuye la síntesis de esta hormona en el cerebro (Biegon et al., 2010) y la organización neuronal en esta estructura está influida por las hormonas gonadales (McCarthy, 2009). Sin embargo, en contra de esta idea, no se encontró activación de esta estructura en animales que fueron tratados prenatalmente con letrozol y que cuando adultos presentaron preferencia por la hembra.

La diferencia en la actividad cerebral asociada a la preferencia sexual, no se encontró en las cortezas prelímbica e infralímbica, lo cual puede deberse a la diferencia en la especialización de cada una de las áreas de la corteza; así, estas estructuras están asociadas con otros procesos cognitivos como el miedo o la memoria (Hajszan et al., 2007).

Cabe mencionar que se encuentra en preparación el análisis de otras estructuras asociadas con la expresión de la conducta sexual y la preferencia sexual, primordialmente de la vía olfativa accesoria e hipotalámicas, que, por limitaciones temporales no fueron incluidas en el presente trabajo.

Otra consideración importante es la naturaleza de la prueba. A diferencia de estudios previos (Bakker et. al 1996b; Paredes et al., 1998) donde los animales fueron expuestos al aserrín, en el presente estudio el animal fue expuesto al estímulo completo (otro animal). Esta diferencia conlleva ventajas y desventajas; por un lado la exposición a sólo el estímulo olfativo limita la participación de otros sistemas, por ejemplo el visual, lo que a su vez vuelve más compleja la interacción del sujeto experimental con el estímulo, pero lo acerca más a un escenario natural. En este trabajo se consideraron posibles factores que pudieran estar influyendo en los resultados, como la presencia/ausencia del estímulo o la activación basal frente al cuarto de prueba. Sin embargo, sería interesante realizar una comparación con la actividad cerebral en hembras ante el mismo estímulo, tal y como se ha hecho en humanos (Savic et al., 2005), para analizar si la activación de las estructuras depende de la preferencia o del sexo.

En este objetivo, los animales utilizados se obtuvieron de madres tratadas con letrozol, resulta interesante para futuros trabajos evaluar si la activación de las áreas cerebrales esta relacionada con la manipulación prenatal (multiparidad, estrés o tratamiento con letrozol).

Parte del objetivo de este trabajo fue caracterizar no sólo las estructuras que se asocian a la preferencia sexual, sino proponer un posible circuito de activación asociado con la misma. Con los resultados obtenidos que se resumen en la tabla 7, podemos proponer que una vez que los animales son expuestos al estímulo de su preferencia, el MPOA recibe información sensorial proveniente de la parte central de la vía olfativa accesoria y reconce al macho como un potencial compañero sexual. Además, se activan el núcleo accumbens, posiblemente con el fin de que se

inicie la búsqueda de contacto con el estímulo reforzante, y la corteza anterior del cíngulo, estructura que modula la búsqueda (conducta orientada a meta) y la aproximación hacia el macho experto. Del mismo modo la estimulación de la amígdala basolateral podría estar incentivando la motivación sexual hacia el macho, al mismo tiempo que la amígdala medial posteroventral se inhibiría, ya que el macho experto no representa un estímulo amenazante o aversivo. Naturalmente este circuito es muy especulativo y está basado en los resultados obtenidos. Futuros estudios funcionales (registros en libre movimiento, inactivación de áreas) son necesarios para confirmarlo y para establecer una posible relación temporal en la activación de estas estructuras.

9.3 Conclusiones

Uno de los hallazgos más importantes de esta investigación fue que, de manera espontánea, hay un aumento en el porcentaje de machos con preferencia por individuos de su mismo sexo (39%) en machos nacidos de hembras multíparas (vs. un 5% en sujetos nacidos de hembras primíparas). En estos animales, la conducta de eyaculación disminuye, pero las conductas de monta e intromisión no se afectan. La conducta sexual femenina (conductas proceptivas y de lordosis) se incrementa en los machos nacidos de hembras multíparas con preferencia por el macho. Este resultado valida la hipótesis planteada.

Otro factor asociado a la preferencia sexual es el estrés prenatal, en este caso se encontró que produce un incremento en el porcentaje de machos con preferencia hacia sujetos de su mismo sexo (31%), en comparación con el control (4%). La combinación de estrés prenatal y tratamiento con letrozol no incrementó el

porcentaje de machos con preferencia por sujetos de su mismo sexo, posiblemente porque comparten una vía en común, la inhibición de aromatasa. La conducta sexual masculina disminuyó y la conducta sexual femenina incrementó en los grupos de machos estresados, y este incremento fue más evidente en machos que recibieron la combinación de tratamientos (letrozol + estrés).

Cuando se evaluó la actividad cerebral asociada a la expresión de la proteína c-Fos ante la presencia de un macho sexualmente experto, se encontró que en los machos que prefieren al macho hubo un incremento de c-Fos en Acg, NAcc y MPOA, confirmando lo propuesto en la hipótesis. Lo anterior podía indicar que estas estructuras se asocian a la elección de un potencial compañero sexual en roedores.

9.4 Perspectivas

- Evaluar la preferencia sexual en otros modelos de preferencia que estén más asociados al componente apetitivo de la conducta sexual, como la prueba de motivación sexual incentiva o el laberinto en Y.
- Evaluar otras conductas sexualmente dimórficas que pudieron alterarse durante el periodo de diferenciación sexual cerebral como la conducta de juego en animales con los tratamientos utilizados que demostraron modificar la preferencia sexual.
- Evaluar la preferencia sexual de animales nacidos de hembras con 2 y 3 partos previos.
- Determinar si se puede lograr una interacción entre la multiparidad y el letrozol utilizando dosis subefectivas para el establecimiento de la preferencia sexual.
- Determinar la participación de las moléculas inmunológicas (citocinas, prostaglandinas y anticuerpos maternos) durante el desarrollo en el establecimiento de la preferencia sexual.
- Evaluar el número de astrocitos y la actividad de la microglía en diferentes etapas del proceso de diferenciación sexual.
- Comparar la actividad cerebral medida por la expresión de la proteína c-Fos ante un macho experto de machos que prefieren a su mismo sexo con la activación que ocurre en hembras sexualmente receptivas.
- Evaluar la actividad cerebral de los animales en el momento en el que eligen al potencial compañero sexual mediante un registro en libre movimiento.
- Analizar el patrón de activación cerebral, mediante la normalización a puntajes z del número de células inmunoreactivas a c-Fos en todas las estructuras, para poder proponer un circuito de activación cerebral.

CAPÍTULO 10

Referencias

- Acharya, Y., Mv, R., Acharya, B., Rnk, P., Bv, R. (2017). Understanding Homosexuality: *Challenges and Limitations Journal of Morphology and Anatomy*, 1(1), 1–3.
- Adekunbi D. A., Li X. F., Lass G., Shetty K., Adegoke O. A., Yeo S. H., O'Byrne K. T. (2018). Kisspeptin neurones in the posterodorsal medial amygdala modulate sexual partner preference and anxiety in male mice. *Journal of Neuroendocrinology*. (30)3, e12572. <http://doi.org/10.1111/jne.12572>
- Agmo, A. (2003). Unconditioned sexual incentive motivation in the male Norway Rat (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology* (Washintong D.C.: 1983), 117(1),3-14. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.117.1.3>
- Ågmo, A. (1999). Sexual motivation - An inquiry into events determining the occurrence of sexual behavior. *Behavioural Brain Research*, 105(1), 129–150. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(99\)00088-1](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(99)00088-1)
- Ågmo, A., Villalpando, A., Picker, Z., Fernández, H. (1995). Lesions of the medial prefrontal cortex and sexual behavior in the male rat. *Brain Research*. 696, 177-186. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00852-H](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00852-H)
- Ahmed E.I., Zher J.L., Schulz K.M., Lorenz B. H., DonCarlos L., Sisk, C. L. (2008). Pubertal hormones modulate the addition of new cells to sexually dimorphic brain regions. *Nature Neuroscience*. 11(9):995-997. 10.1038/nn.2178.
- Allen L. S. & Gorski R. A. (1992). Sexual orientation and the size of the anterior commissure in the human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89(15), 7199–7202. <http://doi.org/10.1073/pnas.89.15.7199>
- Amateau, S. K. & McCarthy, M. M. (2004). Induction of PGE2 by estradiol mediates developmental masculinization of sex behavior. *Nature Neuroscience*, 7(6), 643–650. <https://doi.org/10.1038/nn1254>
- Angoa-Pérez, M., Herrera-Mundo, N., Kane, M. J., Sykes, C. E., Anneken, J. H., Francescutti, D. M., Kuhn, D. M. (2015). Brain serotonin signaling does not determine sexual preference in male mice. *PLoS ONE*, 10(2), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118603>
- Arnold, A. P. (1996). Genetically triggered sexual differentiation of brain and behavior. *Hormones and Behavior*. 30(4), 495–505 <https://doi.org/10.1006/hbeh.1996.0053>

- Aste, N., Honda, S., Harada, N. (2003). Forebrain Fos responses to reproductively related chemosensory cues in aromatase knockout mice. *Brain Research Bulletin*, 60(3), 191–200. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(03\)00035-2](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(03)00035-2)
- Bailey, J. M., Willerman, L., Parks, C. (1991). A test of the maternal stress theory of human male homosexuality. *Archives of Sexual Behavior*, 20(3), 277–293. <https://doi.org/10.1007/BF01541847>
- Bakker J., Brand T., Ophemert J., Slob A. K. (1993). Hormonal regulation of adult partner preference behavior in neonatally ATD-treated male rats. *Behavioral Neuroscience*, 107(3):480-487. 10.1037//0735-7044.107.3.480.
- Bakker J., Van Ophemert J., Slob A. K. (1996a). Sexual differentiation of odor and partner preference in the rat. *Physiology and Behavior*, 60(2):489–494. [http://doi.org/10.1016/0031-9384\(96\)00066-2](http://doi.org/10.1016/0031-9384(96)00066-2).
- Bakker J., Baum M. J., Slob A. K. (1996b). Neonatal inhibition of brain estrogen synthesis alters adult neural fos responses to mating and pheromonal stimulation in the male rat. *Neuroscience*, 74(1): 251–260. [http://doi.org/10.1016/0306-4522\(96\)00096-6](http://doi.org/10.1016/0306-4522(96)00096-6).
- Bakker, J., De Mees, C., Douhard, Q., Balthazart, J., Gabant, P., Szpirer, J., Szpirer, C. (2006). Alpha-fetoprotein protects the developing female mouse brain from masculinization and defeminization by estrogens. *Nature Neuroscience*, 9(2), 220–226. <https://doi.org/10.1038/nn1624>
- Balfour, M. E., Brown, J. L., Yu, L., Coolen, L. M. (2006). Potential contributions of efferents from medial prefrontal cortex to neural activation following sexual behavior in the male rat. *Neuroscience*. 137(4), 1259–1276. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.11.013>
- Balthazart, J., & Ball, G. F. (1998). New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase). *Trends in Neurosciences*, 21(6), 243–249. DOI: 10.1016/s0166-2236(97)01221-6
- Balthazart, J., Baillien, M., Ball, G. F. (2002). Interactions between aromatase (estrogen synthase) and dopamine in the control of male sexual behavior in quail. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 132(1), 37–55. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(01\)00531-0](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(01)00531-0)
- Balthazart J. (2012). The biology of homosexuality. *Oxford University Press*. 188 pp.
- Baum M. J. (2003). Activational and organizational effects of estradiol on male behavioral neuroendocrine function. *Scandinavian Journal of Psychology*, 44(3), 213-220. <http://doi.org/10.1111/1467-9450.00338>.

- Baum, M. J., & 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. *Neuroscience*, 50(3), 627–646. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90452-8](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90452-8)
- Beier, K. T., Steinberg, E. E., Deloach, K. E., Xie, S., Miyamichi, K., Schwarz, L., Gao, X. J., Kremer, E. J., Malenka, R. C., Luo, L. (2015). Circuit Architecture of VTA Dopamine Neurons Revealed by Systematic Input-Output Mapping. *Cell*. 162(3), 622–634. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.015>
- Bell, M. R. (2018). Comparing postnatal development of gonadal hormones and associated social behaviors in rats, mice, and humans. *Endocrinology*, 159(7), 2596–2613. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00220>
- Bemben, M. A., Shipman, S. L., Hirai, T., Herring, B. E., Li, Y., Badger, J. D., Nicoll, R. A., Diamond, J. S., Roche, K. W. (2014). CaMKII phosphorylation of neuroligin-1 regulates excitatory synapses. *Nature Neuroscience*, 17(1), 56–64. <https://doi.org/10.1038/nn.3601>
- Beny-Shefer Y., Zilkha N., Lavi-Avnon Y., Bezalel N., Rogachev I., Brandis, A., Kimchi T. (2017). Nucleus Accumbens Dopamine Signaling Regulates Sexual Preference for Females in Male Mice. *Cell Reports*. 21(11), 3079–3088. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.062>
- Berenbaum S. A. & Beltz A. M. (2011). Sexual differentiation of human behavior: Effects of prenatal and pubertal organizational hormones. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 32(2), 183-200. <http://doi.org/10.1016/j.yfrne.2011.03.001>.
- Bergan, J. F., Ben-Shaul, Y., Dulac, C. (2014). Sex-specific processing of social cues in the medial amygdala. *ELife*. 3, e02743. <https://doi.org/10.7554/elife.02743>
- Bhatnagar A. S., Häusler A., Schieweck K., Lang M., Bowman R. (1990). Highly selective inhibition of estrogen biosynthesis by CGS 20267, a new non-steroidal aromatase inhibitor. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 37(6), 1021–1027. [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(90\)90460-3](https://doi.org/10.1016/0960-0760(90)90460-3).
- Biały, M., & Kaczmarek, L. (1996). c-Fos expression as a tool to search for the neurobiological base of the sexual behaviour of males. *Acta neurobiologiae experimentalis*, 56(2), 567–577.
- Bian, C., Zhao, Y., Guo, Q., Xiong, Y., Cai, W., Zhang, J. (2014). Aromatase inhibitor letrozole downregulates steroid receptor coactivator-1 in specific brain regions that primarily related to memory, neuroendocrine and integration. *Journal of*

Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 141, 37–43.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.12.020>

- Biegon, A., Kim, S. W., Alexoff, D. L., Jayne, M., Carter, P., Hubbard, B., King, P., Logan, J., Muench, L., Pareto, D., Schlyer, D., Shea, C., Telang, F., Wang, G. J., Xu, Y., Fowler, J. S. (2010). Unique distribution of aromatase in the human brain: In vivo studies with PET and [N-methyl-11C]vorozole. *Synapse*, 64(11), 801–807. <https://doi.org/10.1002/syn.20791>
- Blanchard, R., & Bogaert, A. F. (1996). Homosexuality in men and number of older brothers. *The American journal of psychiatry*, 153(1), 27–31. <https://doi.org/10.1176/ajp.153.1.27>
- Blanchard R. & Klassen P. (1997). H-Y antigen and homosexuality in men. *Journal of Theoretical Biology*, 185(3) 373–378. <http://doi.org/10.1006/jtbi.1996.0315>.
- Blanchard R. (2001). Fraternal birth order and the maternal immune hypothesis of male homosexuality. *Hormones and Behavior*, 40(2)105–114. <http://doi.org/10.1006/hbeh.2001.1681>.
- Blanco P., Sargent C. A., Boucher C. A., Mitchell M., Affara N. A. (2000). Conservation of PCDHX in mammals; expression of human X/Y genes predominantly in brain. *Mamm Genome*, 11(10):906–914. <http://doi.org/10.1007/s003350010177> [pii].
- Brand T., Kroonen J., Mos J., Slob A.K. (1991) Adult partner preference and sexual behavior of male rats affected by perinatal endocrine manipulations. *Hormones and Behavior*, 25 (3)323–341. doi: 10.1016/0018-506X(91)90005-3
- Bocklandt S., Horvath S., Vilain E., Hamer D. H. (2006). Extreme skewing of X-chromosome inactivation in mothers of homosexual men. *Human Genetics*, 118(6), 691–694. <http://doi.org/10.1007/s00439-005-0119-4>.
- Bogaert A. F. & Skorska M. (2011). Sexual orientation, fraternal birth order, and the maternal immune hypothesis: A review. *Frontiers in Neuroendocrinology*, (32)247-254. <http://doi.org/10.1016/j.yfrne.2011.02.004>.
- Bogaert, A. F., Skorska, M. N., Wang, C., Gabrie, J., MacNeil, A. J., Hoffarth, M. R., VanderLaan, D. P., Zucker, K. J., Blanchard, R. (2018). Male homosexuality and maternal immune responsivity to the Y-linked protein NLGN4Y. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(2), 302–306. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705895114>
- Bostwick W. B., Boyd C. J., Hughes T. L., McCabe S. E. (2010). Dimensions of sexual orientation and the prevalence of mood and anxiety disorders in the United States. *American Journal of Public Health*, 100(3), 468–475. <http://doi.org/10.2105/AJPH.2008.152942>.

- Buzdar A. U. (2002). New generation aromatase inhibitors--from the advanced to the adjuvant setting. *Breast Cancer Research and Treatment*, 75(Suppl 1), S13–S17; discussion S33–S35. <http://doi.org/10.1023/A:1020305615033>.
- Cai, Z., Pan, Z. L., Pang, Y., Evans, O. B., Rhodes, P. G. (2000). Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration. *Pediatric Research*, 47(1), 64–72. <https://doi.org/10.1203/00006450-200001000-00013>
- Cardinal, R. N., Parkinson, J. A., Marbini, H. D., Toner, A. J., Bussey, T. J., Robbins, T. W., Everitt, B. J. (2003). Role of the anterior cingulate cortex in the control over behavior by Pavlovian conditioned stimuli in rats. *Behavioral Neuroscience*, 117(3), 566–587. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.117.3.566>
- Care, A. S., Bourque, S. L., Morton, J. S., Hjartarson, E. P., Davidge, S. T. (2015). Effect of Advanced Maternal Age on Pregnancy Outcomes and Vascular Function in the Rat. *Hypertension*, 65(6):1324-30 <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05167>
- Charil, A., Laplante, D. P., Vaillancourt, C., King, S. (2010). Prenatal stress and brain development. *Brain Research Reviews*, 65(1), 56–79. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2010.06.002>
- Cherry, J. A., & Baum, M. J. (2020). Sex differences in main olfactory system pathways involved in psychosexual function. *Genes, Brain and Behavior*, 19(2), 1–12. <https://doi.org/10.1111/gbb.12618>
- Cooke, B. M. (2006). Steroid-dependent plasticity in the medial amygdala. *Neuroscience*, 138(3):997-1005 <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.06.018>
- Cooke, B. M., & Woolley, C. S. (2005). Sexually dimorphic synaptic organization of the medial amygdala. *The Journal of Neuroscience*, 25(46), 10759–10767 <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2919-05.2005>
- Coolen, Lique M., Peters, H. J. P. W., Veening, J. G. (1996). Fos immunoreactivity in the rat brain following consummatory elements of sexual behavior: A sex comparison. *Brain Research*, 738(1), 67–82. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00763-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00763-9)
- Coolen, L. M., Peters, H. J. P. W., Veening, J. G. (1997). Distribution of Fos immunoreactivity following mating versus anogenital investigation in the male rat brain. *Neuroscience*, 77(4), 1151–1161. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(96\)00542-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(96)00542-8)
- Coria-Avila G. A., Cibrian-Llenderal T., Díaz-Estrada V. X., García L. I., Toledo-Cárdenas R., Pfaus J. G., Manzo J. (2018). Brain activation associated

- to olfactory conditioned same-sex partner preference in male rats. *Hormones and Behavior*, 99, 50–56. <http://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.02.005>
- Daly M., Wilson M. I. (1999). Human evolutionary psychology and animal behaviour. *Animal Behavior*. 57: 509–519.
- Day, J. R., La Polt, P. S., Morales, T. H., Lu, J. K. H. (1989). An abnormal pattern of embryonic development during early pregnancy in aging rats. *Biology of Reproduction*, 41(5), 933–939. <https://doi.org/10.1095/biolreprod41.5.933>
- Davis J. F., Loos M., Di Sebastiano A. R., Brown J. L., Lehman M. N., Coolen L. M. (2010). Lesions of the Medial Prefrontal Cortex Cause Maladaptive Sexual Behavior in Male Rats. *Biological Psychiatry*. 67(12), 1199–1204. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.12.029>
- Davis, M., & Whalen, P. J. (2001). The amygdala: Vigilance and emotion. *Molecular Psychiatry*, 6(1), 13–34. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000812>
- Dean A. & Sharpe R.M. (2013). Anogenital distance or digit length ratio as measures of fetal androgen exposure: Relationship to male reproductive development and its disorders. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98, 2230–2238. [10.1210/jc.2012-4057](https://doi.org/10.1210/jc.2012-4057).
- De Jonge, F. H., Louwerse, A. L., Ooms, M. P., Evers, P., Endert, E., Van De Poll, N. E. (1989). Lesions of the SDN-POA inhibit sexual behavior of male wistar rats. *Brain Research Bulletin*, 23(6), 483–492. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(89\)90194-9](https://doi.org/10.1016/0361-9230(89)90194-9)
- Dela Cruz C. & Pereira O. (2012). Prenatal testosterone supplementation alters puberty onset, aggressive behavior, and partner preference in adult male rats. *The Journal of Physiological Sciences, JPS*, 62(2), 123–131. <https://doi.org/10.1007/s12576-011-0190-7>.
- De Souza, M. A., Centenaro, L. A., Menegotto, P. R., Henriques, T. P., Bonini, J., Achaval, M., Lucion, A. B. (2013). Prenatal stress produces social behavior deficits and alters the number of oxytocin and vasopressin neurons in adult rats. *Neurochemical Research*, 38(7), 1479–1489. <https://doi.org/10.1007/s11064-013-1049-5>
- Domínguez-Salazar E., Portillo W., Baum M. J., Bakker J., Paredes R. G. (2002). Effect of prenatal androgen receptor antagonist or aromatase inhibitor on sexual behavior, partner preference and neuronal Fos responses to estrous female odors in the rat accessory olfactory system. *Physiology and Behavior*. 75(3), 337–346. [http://doi.org/10.1016/S0031-9384\(01\)00674-6](http://doi.org/10.1016/S0031-9384(01)00674-6)
- Dörner G., Schenk B., Schmiedel B., Arhens L. (1983). Stressful events in prenatal life of bi- and homosexual men. *Experimental and Clinical Endocrinology*, 81(1), 83-87. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1210210>

- Dulac, C., & Wagner, S. (2006). Genetic analysis of brain circuits underlying pheromone signaling. *Annual Review of Genetics*, 40, 449–467. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.073003.093937>
- Ellis L., Peckham W., Ames M. A., Burke D. (1988). Sexual orientation of human offspring may be altered by severe maternal stress during pregnancy. *Journal of Sex Research*, 25(1), 152-157. <http://doi.org/10.1080/00224498809551449>.
- Ellis L. & Cole-Harding S. (2001). The effects of prenatal stress, and of prenatal alcohol and nicotine exposure, on human sexual orientation. *Physiology and Behavior*, 74(1-2), 213–26. [http://doi.org/10.1016/S0031-9384\(01\)00564-9](http://doi.org/10.1016/S0031-9384(01)00564-9).
- Erskine, M. S. (1989). Solicitation behavior in the estrous female rat: A review. *Hormones and Behavior*, 23(4), 473–502. [https://doi.org/10.1016/0018-506X\(89\)90037-8](https://doi.org/10.1016/0018-506X(89)90037-8)
- Fekete, É. M., Zhao, Y., Li, C., Sabino, V., Vale, W. W., Zorrilla, E. P. (2009). Social defeat stress activates medial amygdala cells that express type 2 corticotropin-releasing factor receptor mRNA. *Neuroscience*, 162(1), 5–13. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.03.078>
- Fester, L., Prange-Kiel, J., Jarry, H., Rune, G. M. (2011). Estrogen synthesis in the hippocampus. *Cell and Tissue Research*, 345(3), 285–294. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1221-7>
- Ford C. & Beach F. A. (1951). *Patterns of sexual behavior*. Oxford, England: Harpeand Paul B. Hoeber. 8:307 pp.
- García-Cardenas N., Olvera-Hernández S., Gómez-Quintanar B., Fernández-Guasti A. (2015). Male rats with same sex preference show high experimental anxiety and lack of anxiogenic-like effect of fluoxetine in the plus maze test. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 135, 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.05.017>
- Ghods-Sharifi, S., St. Onge, J. R., Floresco, S. B. (2009). Fundamental contribution by the basolateral amygdala to different forms of decision making. *Journal of Neuroscience*, 29(16), 5251–5259. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0315-09.2009>
- Glaser, R., & Kiecolt-Glaser, J. K. (2005). Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nature reviews. Immunology*, 5(3), 243–251. <https://doi.org/10.1038/nri1571>
- Gómez, B., & Escobar, A. (2006). Estrés y el sistema inmunológico. *Revista Mexicana de Neurociencia*.
- Grant, E. (1963). An Analysis of the Social Behaviour of the Male Laboratory Rat. *Behaviour*, 21(3/4), 260-281

- Gunaydin, L. A., Grosenick, L., Finkelstein, J. C., Kauvar, I. V., Fenno, L. E., Adhikari, A., Lammel, S., Mirzabekov, J. J., Airan, R. D., Zalocusky, K. A., Tye, K. M., Anikeeva, P., Malenka, R. C., Deisseroth, K. (2014). Natural neural projection dynamics underlying social behavior. *Cell*, 157(7), 1535–1551. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.017>
- Hajszan, T., MacLusky, N. J., Johansen, J. A., Jordan, C. L., & Leranth, C. (2007). Effects of androgens and estradiol on spine synapse formation in the prefrontal cortex of normal and testicular feminization mutant male rats. *Endocrinology*, 148(5), 1963–1967. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1626>
- Haller, J. (2018). The role of central and medial amygdala in normal and abnormal aggression: A review of classical approaches. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 85, 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.09.017>
- Harding, S. M., & McGinnis, M. Y. (2003). Effects of testosterone in the VMN on copulation, partner preference, and vocalizations in male rats. *Hormones and Behavior*, 43(2), 327–335. [https://doi.org/10.1016/S0018-506X\(02\)00049-1](https://doi.org/10.1016/S0018-506X(02)00049-1)
- Hart, B. L., & Leedy, M. G. (1983). Female sexual responses in male cats facilitated by olfactory bulbectomy and medial preoptic/anterior hypothalamic lesions. *Behavioral Neuroscience*, 97(4), 608–614. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.97.4.608>
- He, F., Wu, R., Yu, P. (2014). Study of Fos, androgen receptor and testosterone expression in the sub-regions of medial amygdala, bed nucleus of stria terminalis and medial preoptic area in male mandarin voles in response to chemosensory stimulation. *Behavioural Brain Research*, 258, 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.10.004>
- Heijkoop, R., Huijgens, P. T., Snoeren, E. M. S. (2018). Assessment of sexual behavior in rats: The potentials and pitfalls. *Behavioural Brain Research*, 352, 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.10.029>
- Henley, C. L., Nunez, A. A., Clemens, L. G. (2011). Hormones of choice: The neuroendocrinology of partner preference in animals. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 32(2), 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2011.02.010>
- Hennessey, A. C., Wallen, K., Edwards, D. A. (1986). Preoptic lesions increase the display of lordosis by male rats. *Brain Research*, 370(1), 21–28. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)91100-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)91100-5)
- Hernández, A., & Fernández-Guasti, A. (2018). Male rats with same-sex preference show higher immobility in the forced swim test, but similar effects of fluoxetine and desipramine than males that prefer females. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 171, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2018.05.017>

- Hernández, A., Olvera-Hernández, S., Fernández-Guasti, A. (2020). Lack of interaction between prenatal stress and prenatal letrozole to induce same-sex preference in male rats. *Physiology & Behavior*, 224, 113042. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113042>
- Hernández-González, M., Aguirre, F. A. R., Guevara, M. Á., Quirarte, G. L., Magallanes, P. H. (2014). Basolateral Amygdala Inactivation Reduces Sexual Motivation in Male Rats during Performance of a T-Maze Task with a Sexual Reward. *Journal of Behavioral and Brain Science*, 4(5) 223-233. <https://doi.org/10.4236/jbbs.2014.45024>
- Hernández-Lallement, J., van Wingerden, M., Schäble, S., Kalenscher, T. (2016). Basolateral amygdala lesions abolish mutual reward preferences in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 127, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.11.004>
- Hines, M., Allen, L. S., Gorski, R. A. (1992). Sex differences in subregions of the medial nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. *Brain research*, 579(2), 321–326. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90068-k](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90068-k)
- Holson, R. R., Gough, B., Sullivan, P., Badger, T., Sheehan, D. M. (1995). Prenatal dexamethasone or stress but not ACTH or corticosterone alter sexual behavior in male rats. *Neurotoxicology and teratology*, 17(4), 393–401. [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(94\)00074-n](https://doi.org/10.1016/0892-0362(94)00074-n)
- Houtsmuller, E. J., Brand, T., de Jonge, F. H., Joosten, R. N., van de Poll, N. E., & Slob, A. K. (1994). SDN-POA volume, sexual behavior, and partner preference of male rats affected by perinatal treatment with ATD. *Physiology & Behavior*, 56(3), 535–541. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)90298-4](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90298-4)
- Hu, S. H., Wei, N., Wang, Q. D., Yan, L. Q., Wei, E. Q., Zhang, M. M., Hu, J. B., Huang, M. L., Zhou, W. H., Xu, Y. (2008). Patterns of brain activation during visually evoked sexual arousal differ between homosexual and heterosexual men. *AJNR. American Journal of Neuroradiology*, 29(10), 1890–1896. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A1260>
- Hughes, A. M., Everitt, B. J., Herbert, J. (1990). Comparative effects of preoptic area infusions of opioid peptides, lesions and castration on sexual behaviour in male rats: studies of instrumental behaviour, conditioned place preference and partner preference. *Psychopharmacology*, 102(2), 243–256. <https://doi.org/10.1007/BF02245929>
- Hull, E. M., & Dominguez, J. M. (2007). Sexual behavior in male rodents. *Hormones and Behavior*, 52(1), 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.03.030>

- Hull, E. M., & Dominguez, J. M. (2015). Male Sexual Behavior. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction: Two-Volume Set*. 2211-2285
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00049-1>
- Hull, E.M., & Rodriguez-Manzo, G. (2009). Male Sexual Behavior. In Ptaff, D. W., Arnold, A. P., Etgen, A. M., Farhrbach, S. E. & Rubin, R. T. (eds). vol. 1. *Hormones, Brain and Behavior*, pp. 5–65, San Diego, Academic Press
- Hurtazo, H. A., & Paredes, R. G. (2005). Olfactory preference and Fos expression in the accessory olfactory system of male rats with bilateral lesions of the medial preoptic area/anterior hypothalamus. *Neuroscience*, 135(4), 1035–1044.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.07.012>
- Hurtazo, H. A., Paredes, R. G., Agmo, A. (2008). Inactivation of the medial preoptic area/anterior hypothalamus by lidocaine reduces male sexual behavior and sexual incentive motivation in male rats. *Neuroscience*, 152(2), 331–337.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.10.063>
- Iyilikci, O., Balthazart, J., Ball, G. F. (2016). Medial preoptic regulation of the ventral tegmental area related to the control of sociosexual behaviors. *ENeuro*, 3(6),
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0283-16.2016>
- Jahagirdar V., Quadros P., Wagner, C. K. (2008). Endogenous oestradiol regulates progesterone receptor expression in the brain of female rat fetuses: What is the source of oestradiol?. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(3), 359–365.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01647.x>
- Jaworski, J., Kalita, K., Knapska, E. (2018). c-Fos and neuronal plasticity: the aftermath of Kaczmarek's theory. *Acta neurobiologiae experimentalis*, 78(4), 287–296.
- Jensch, R. P., Brent, R. L., Barr, M., Jr (1970). The litter effect as a variable in teratologic studies of the albino rat. *The American Journal of Anatomy*, 128(2), 185–191. <https://doi.org/10.1002/aja.1001280205>
- Jimbo, M., Okubo, K., Toma, Y., Shimizu, Y., Saito, H., Yanaihara, T. (1998). Inhibitory effects of catecholamines and maternal stress on aromatase activity in the fetal rat brain. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 24(4), 291–297. <https://doi.org/10.1111/j.1447-0756.1998.tb00092.x>
- Jiménez-Velázquez, G., López-Muñoz, F. J., Fernández-Guasti, A. (2010). Parallel anxiolytic-like and antinociceptive actions of diazepam in the anterior basolateral amygdala and dorsal periaqueductal gray. *Brain Research*, 1349, 11–20.<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.06.014>
- Juntti, S. A., Coats, J. K., Shah, N. M. (2008). A genetic approach to dissect sexually dimorphic behaviors. *Hormones and Behavior*, 53(5), 627–637.
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.12.012>

- Juraska, J. M., Sisk, C. L., DonCarlos, L. L. (2013). Sexual differentiation of the adolescent rodent brain: Hormonal influences and developmental mechanisms. *Hormones and Behavior*, 64(2), 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.05.010>
- Kaplan, M. E., & McGinnis, M. Y. (1989). Effects of ATD on male sexual behavior and androgen receptor binding: A reexamination of the aromatization hypothesis. *Hormones and Behavior*, 23(1), 10–26. [https://doi.org/10.1016/0018-506x\(89\)90071-8](https://doi.org/10.1016/0018-506x(89)90071-8)
- Kay, G., Tarcic, N., Poltyrev, T., Weinstock, M. (1998). Prenatal stress depresses immune function in rats. *Physiology and Behavior*, 63(3), 397–402. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(97\)00456-3](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(97)00456-3)
- Kellogg, C. K., & Lundin, A. (1999). Brain androgen-inducible aromatase is critical for adolescent organization of environment-specific social interaction in male rats. *Hormones and Behavior*, 35(2), 155–62. <http://doi.org/10.1006/hbeh.1998.1508>.
- Kennedy, H. (1997). Karl Heinrich Ulrichs First Theorist of Homosexuality. In Routledge (ed.). *Science and Homosexualities*, pp. 26-45. New York, Vernon Rosario
- Keshavarzi, S., Sullivan, R. K., Ianno, D. J., Sah, P. (2014). Functional properties and projections of neurons in the medial amygdala. *The Journal of Neuroscience*, 34(26), 8699–8715. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1176-14.2014>
- Kim, D. R., Bale, T. L., Epperson, C. N. (2015). Prenatal programming of mental illness: current understanding of relationship and mechanisms. *Current psychiatry reports*, 17(2), 5. <https://doi.org/10.1007/s11920-014-0546-9>
- Kindon, H. A., Baum, M. J., Paredes, R. J. (1996). Medial preoptic/anterior hypothalamic lesions induce a female-typical profile of sexual partner preference in male ferrets. *Hormones and Behavior*. 30(4), 514–527. <http://doi.org/10.1006/hbeh.1996.0055>
- Kinsey, A. C., Pomeroy, W. R., Martin, C. E. (2003). Sexual behavior in the human male. 1948. *American Journal of Public Health*, 93(6), 894–898. <https://doi.org/10.2105/ajph.93.6.894>
- Kolb B., & Stewart J. (1991). Sex-Related Differences in Dendritic Branching. *Journal of Neuroendocrinology*, 3(1), 95–99. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2826.1991.tb00245.x>
- Kolb, B. (2007). Do all mammals have a prefrontal cortex? In *Evolution of Nervous Systems*, 443-450. <https://doi.org/10.1016/B0-12-370878-8/00081-1>

- Kolb, B., & Gibb, R. (2015). Plasticity in the prefrontal cortex of adult rats. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 15. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00015>
- Kondo, Y., & Sachs, B. D. (2002). Disparate effects of small medial amygdala lesions on noncontact erection, copulation, and partner preference. *Physiology and Behavior*, 76(4–5), 443–447. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(02\)00682-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(02)00682-0)
- Kovács K. J. (1998). c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochemistry international*, 33(4), 287–297. [https://doi.org/10.1016/s0197-0186\(98\)00023-0](https://doi.org/10.1016/s0197-0186(98)00023-0)
- Kovács K. J. (2008). Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. *Journal of neuroendocrinology*, 20(6), 665–672. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01734.x>
- LeDoux, J. (2003). The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 23(4-5), 727–738. <https://doi.org/10.1023/A:1025048802629>
- Lee, P. R., Brady, D. L., Shapiro, R. A., Dorsa, D. M., Koenig, J. I. (2007). Prenatal stress generates deficits in rat social behavior: Reversal by oxytocin. *Brain Research*, 1156(1), 152–167. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.04.042>
- Lenz, K. M., Nugent, B. M., Haliyur, R., McCarthy, M. M. (2013). Microglia are essential to masculinization of brain and behavior. *The Journal of Neuroscience*, 33(7), 2761–2772. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1268-12.2013>
- Lenz, K. M., Pickett, L. A., Wright, C. L., Davis, K. T., Joshi, A., McCarthy, M. M. (2018). Mast Cells in the Developing Brain Determine Adult Sexual Behavior. *The Journal of neuroscience*, 38(37), 8044–8059. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1176-18.2018>
- Lephart, E. D. (1996). A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain Research Reviews*, 22(1), 1–26. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(96\)00002-1](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(96)00002-1)
- LeVay S. (1991). A difference in hypothalamic structure between heterosexual and homosexual men. *Science*, 253(5023), 1034–1037. <http://doi.org/10.1126/science.1887219>
- Lim, C. R., Harris, K., Dawson, J., Beard, D. J., Fitzpatrick, R., Price, A. J. (2015). Floor and ceiling effects in the OHS: An analysis of the NHS PROMs data set. *BMJ Open*, 5(7). <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-007765>

- Liu, Y., Jiang, Y., Si, Y., Kim, J. Y., Chen, Z. F., Rao, Y. (2011). Molecular regulation of sexual preference revealed by genetic studies of 5-HT in the brains of male mice. *Nature*, 472(7341), 95–99. <https://doi.org/10.1038/nature09822>
- Lloyd, S. A. C., & Dixson, A. F. (1988). Effects of hypothalamic lesions upon the sexual and social behaviour of the male common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Brain Research*, 463(2), 317–329. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)90405-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)90405-2)
- Lucas, D. & Fox J. (2018). Human sexual anatomy and physiology. In R. Biswas-Diener & E. Diener (Eds), *Noba textbook series: Psychology*. Champaign, IL: DEF publishers. DOI:nobaproject.com
- Maras, P. M., & Petruilis, A. (2006). Chemosensory and steroid-responsive regions of the medial amygdala regulate distinct aspects of opposite-sex odor preference in male Syrian hamsters. *European Journal of Neuroscience*, 24(12), 3541–3552. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05216.x>
- Marchlewska-Koj, A., Kruczek, M., Kapusta, J., Pochroń, E. (2003). Prenatal stress affects the rate of sexual maturation and attractiveness in bank voles. *Physiology & Behavior*, 79(2), 305–310. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(03\)00099-4](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(03)00099-4)
- Matuszczyk J.V, Fernández-Guasti, A., Larsson, K. (1988). Sexual orientation, proceptivity, and receptivity in the male rat as a function of neonatal hormonal manipulation. *Hormones and Behavior*, 22(3), 362–378. [https://doi.org/10.1016/0018-506x\(88\)90008-6](https://doi.org/10.1016/0018-506x(88)90008-6)
- Matuszczyk, J.V., & Larsson K. (1995). Sexual preference and feminine and masculine sexual-behavior of male-rats prenatally exposed to antiandrogen or antiestrogen. *Hormones and Behavior*, 29(2), 191–206. <https://doi.org/10.1006/hbeh.1995.1014>
- McCarthy, M. M. (2008). Estradiol and the developing brain. *Physiological Reviews*, 88, 91–124. <https://doi.org/10.1152/physrev.00010.2007>
- McCarthy, M. M. (2009). The two faces of estradiol: effects on the developing brain. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 15(6), 599–610. <https://doi.org/10.1177/1073858409340924>
- McCarthy, M. M., & Arnold, A. P. (2011). Reframing sexual differentiation of the brain. *Nature Neuroscience*, 14(6), 677–683. <https://doi.org/10.1038/nn.2834>
- McCormick, C. M., Smythe, J. W., Sharma, S., Meaney, M. J. (1995). Sex-specific effects of prenatal stress on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress and brain glucocorticoid receptor density in adult rats. *Brain research. Developmental brain research*, 84(1), 55–61. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(94\)00153-q](https://doi.org/10.1016/0165-3806(94)00153-q)

- McGinnis, M. Y., Williams, G. W., Lumia, A. R. (1996). Inhibition of male sex behavior by androgen receptor blockade in preoptic area or hypothalamus, but not amygdala or septum. *Physiology & Behavior*, 60(3), 783–789. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(96\)00088-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(96)00088-1)
- McLaurin, K. A., & Mactutus, C. F. (2015). Polytocus focus: Uterine position effect is dependent upon horn size. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 40, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2014.11.001>
- Meek, L. R., Schulz, K. M., Keith, C. A. (2006). Effects of prenatal stress on sexual partner preference in mice. *Physiology & Behavior*, 89(2), 133-138. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.05.006>
- Meethal, S. V., & Atwood, C. S. (2005). The role of hypothalamic-pituitary-gonadal hormones in the normal structure and functioning of the brain. *Cellular and Molecular Life Sciences, CMLS*, 62(3), 257–270. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4381-3>
- Meston, C. M., & Buss, D. M. (2007). Why humans have sex. *Archives of Sexual Behavior*, 36(4), 477–507. <https://doi.org/10.1007/s10508-007-9175-2>
- Meyer-Bahlburg, H. F. L. (1984). Psychoendocrine Research on Sexual Orientation. Current Status and Future Options. *Progress in Brain Research*, 61, 375–398. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)64448-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)64448-9)
- Meyer-Bahlburg, H. F. L., Dolezal, C., Baker, S. W., New, M. I. (2008). Sexual orientation in women with classical or non-classical congenital adrenal hyperplasia as a function of degree of prenatal androgen excess. *Archives of Sexual Behavior*, 37(1), 85–99. <https://doi.org/10.1007/s10508-007-9265-1>
- Micevych, P. E., & Meisel, R. L. (2017). Integrating neural circuits controlling female sexual behavior. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 11, 42 <https://doi.org/10.3389/fnsys.2017.00042>
- Mitchell, J. B., & Gratton, A. (1991). Opioid modulation and sensitization of dopamine release elicited by sexually relevant stimuli: a high speed chronoamperometric study in freely behaving rats. *Brain Research*, 551(1-2), 20–27. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)90908-E](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)90908-E)
- Nisbett, R. E. (1972). Hunger, obesity, and the ventromedial hypothalamus. *Psychological Review*, 79(6), 433–453 <https://doi.org/10.1037/h0033519>
- Nugent, B. M., Wright, C. L., Shetty, A. C., Hodes, G. E., Lenz, K. M., Mahurkar, A., Russo, S. J., Devine, S. E., McCarthy, M. M. (2015). Brain feminization requires active repression of masculinization via DNA methylation. *Nature Neuroscience*, 18(5), 690–697. <https://doi.org/10.1038/nn.3988>

- Olvera-Hernández, S., & Fernández-Guasti, A. (2015). Perinatal administration of aromatase inhibitors in rodents as animal models of human male homosexuality: similarities and differences. *Advances in Neurobiology*, 10, 381–406. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1372-5_18
- Olvera-Hernández, S., Chavira, R., Fernández-Guasti, A. (2015). Prenatal letrozole produces a subpopulation of male rats with same-sex preference and arousal as well as female sexual behavior. *Physiology & Behavior*, 139, 403-411. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.11.060>
- Olvera-Hernández, S., Tapia-Rodríguez, M., Swaab, D. F., Fernández-Guasti, A. (2017). Prenatal administration of letrozole reduces SDN and SCN volume and cell number independent of partner preference in the male rat. *Physiology and Behavior*, 171, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.01.001>
- Olvera-Hernández, S., Hernández, A., Reyes, R., Fernández-Guasti, A. (2019). Establishment of partner preference in male rats: Effect of prenatal letrozole and sexual experience. *Hormones & Behavior*, 109, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2019.02.009>
- Palmeira, P., Quinello, C., Silveira-Lessa, A. L., Zago, C. A., Carneiro-Sampaio, M. (2012). IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clinical & Developmental Immunology*, 2012, 985646. <https://doi.org/10.1155/2012/985646>
- Paredes, R. G. (2003). Medial preoptic area/anterior hypothalamus and sexual motivation. *Scandinavian Journal of Psychology*, 44(3), 203–212. <https://doi.org/10.1111/1467-9450.00337>
- Paredes, R. G., & Baum, M. J. (1995). Altered sexual partner preference in male ferrets given excitotoxic lesions of the preoptic area/anterior hypothalamus. *Journal of Neuroscience*, 15(10), 6619–6630. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.15-10-06619.1995>
- Paredes, R. G., & Baum, M. J. (1997). Role of the medial preoptic area/anterior hypothalamus in the control of masculine sexual behavior. *Annual review of sex research*. 8, 68–101. <https://doi.org/10.1080/10532528.1997.10559919>
- Paredes, R. G., Tzschentke, T., Nakach, N. (1998). Lesions of the medial preoptic area/anterior hypothalamus (MPOA/AH) modify partner preference in male rats. *Brain Research*, 813(1), 1–8. [http://doi.org/10.1016/s0006-8993\(98\)00914-7](http://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)00914-7)
- Patin, V., Lordi, B., Vincent, A., Caston, J. (2005). Effects of prenatal stress on anxiety and social interactions in adult rats. *Brain research. Developmental brain research*, 160(2), 265–274. <https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2005.09.010>

- Paxinos, G., & Watson, C. (2004). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: The New Coronal Set*, 5th Edn
- Pei, M., Matsuda, K. I., Sakamoto, H., Kawata, M. (2006). Intrauterine proximity to male fetuses affects the morphology of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in the adult rat brain. *European Journal of Neuroscience*, 23(5), 1234–1240. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04661.x>
- Peper, J. S., Brouwer, R. M., van Leeuwen, M., Schnack, H. G., Boomsma, D. I., Kahn, R. S., Hulshoff Pol, H. E. (2010). HPG-axis hormones during puberty: A study on the association with hypothalamic and pituitary volumes. *Psychoneuroendocrinology*, 35(1), 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.05.025>
- Petrovic, P., Carlsson, K., Petersson, K. M., Hansson, P., Ingvar, M. (2004). Context-dependent deactivation of the amygdala during pain. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 16(7), 1289–1301. <https://doi.org/10.1162/0898929041920469>
- Pfaff, D. W., Schwartz-Giblin, S., McCarthy, M. M., Kow, L.-M. (1994). Cellular and molecular mechanisms of female reproductive behaviors. In *The Physiology of Reproduction*.
- Pfaus, J. G., Damsma, G., Nomikos, G. G., Wenkstern, D. G., Blaha, C. D., Phillips, A. G., Fibiger, H. C. (1990). Sexual behavior enhances central dopamine transmission in the male rat. *Brain Research*, 530(2), 345–348. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91309-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91309-5)
- Phelps, E. A., & LeDoux, J. E. (2005). Contributions of the amygdala to emotion processing: From animal models to human behavior. *Neuron*, 48(2), 175–187. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.09.025>
- Phillips-Farfán, B. V., & Fernández-Guasti, A. (2007). c-Fos expression related to sexual satiety in the male rat forebrain. *Physiology and Behavior*, 91(5), 609–619. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.03.024>
- Piffer R. C., Garcia P. C., Pereira O. C. M. (2009). Adult partner preference and sexual behavior of male rats exposed prenatally to betamethasone. *Physiology and Behavior*, 98(1-2):163–167. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.05.003>
- Poole, J. A., & Claman, H. N. (2004). Immunology of pregnancy: Implications for the mother. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 26(3), 161–170. <https://doi.org/10.1385/CRIAI:26:3:161>
- Puts, D. A., Jordan, C. L., Breedlove, S. M. (2006). O brother, where art thou? The fraternal birth-order effect on male sexual orientation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(28), 10531–10532. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604102103>

- Reinius, B., & Jazin, E. (2009). Prenatal sex differences in the human brain. *Molecular Psychiatry*, 14(11), 988–991. <https://doi.org/10.1038/mp.2009.79>
- Resko, J. A., Perkins, A., Roselli, C. E., Fitzgerald, J. A., Choate, J. V. A., Stormshak, F. (1996). Endocrine correlates of partner preference behavior in rams. *Biology of Reproduction*, 55(1), 120–126. <https://doi.org/10.1095/biolreprod55.1.120>
- Riaz, S., Puvendrakumaran, P., Khan, D., Yoon, S., Hamel, L., Ito, R. (2019). Prelimbic and infralimbic cortical inactivations attenuate contextually driven discriminative responding for reward. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40532-7>
- Robitaille, J. A., & Bovet, J. (1976). Field observations on the social behavior of the Norway rat, *Rattus norvegicus*. *Biology of Behavior*, 1, 289–308.
- Rodriguez-Sierra, J. F., & Terasawa, E. (1979). Lesions of the preoptic area facilitate lordosis behavior in male and female guinea pigs. *Brain Research Bulletin*, 4(4), 513–517. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(79\)90036-4](https://doi.org/10.1016/0361-9230(79)90036-4)
- Robertson, G. S., Pfaus, J. G., Atkinson, L. J., Matsumura, H., Phillips, A. G., Fibiger, H. C. (1991). Sexual behavior increases c-fos expression in the forebrain of the male rat. *Brain research*, 564(2), 352–357. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91477-i](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91477-i)
- Roselli C. E., & Stormshak F. (2009). The neurobiology of sexual partner preferences in rams. *Hormones and Behavior*, 55(5), 611–620. <http://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.03.013>.
- Rosenfeld, C. S., & Roberts, R. M. (2004). Maternal diet and other factors affecting offspring sex ratio: A review. *Biology of Reproduction*, 71(4), 1063–1070. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.030890>
- Rushworth, M. F. S., Walton, M. E., Kennerley, S. W., Bannerman, D. M. (2004). Action sets and decisions in the medial frontal cortex. *Trends in Cognitive Sciences*, 8(9), 410–417. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2004.07.009>
- Sachs, B. D., Akasofu, K., Citron, J. H., Daniels, S. B., Natoli, J. H. (1994). Noncontact stimulation from estrous females evokes penile erection in rats. *Physiology & Behavior*, 55(6), 1073–1079. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)90390-5](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90390-5)
- Safron A., Barch B., Bailey J. M., Gitelman D. R., Parrish T. B., Reber P. J. (2007). Neural correlates of sexual arousal in homosexual and heterosexual men. *Behavioral Neuroscience*, 121(2), 237–248. <http://doi.org/10.1037/0735-7044.121.2.237>

- Saji, F., Samejima, Y., Kamiura, S., Koyama, M. (1999). Dynamics of immunoglobulins at the fetomaternal interface. *Reviews of Reproduction*, 4(2), 81–89. <https://doi.org/10.1530/ror.0.0040081>
- Savic I., Berglund H., Lindström P. (2005). Brain response to putative pheromones in homosexual men. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(20), 7356–7361. <http://doi.org/10.1073/pnas.0407998102>.
- Scalia, F., & Winans, S. S. (1975). The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *Journal of Comparative Neurology*, 161(1), 31–55. <https://doi.org/10.1002/cne.901610105>
- Schlinger, B. A., Soma, K. K., London, S. E. (2001). Neurosteroids and brain sexual differentiation. *Trends in Neurosciences*, 24(8), 429–431. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)01855-5](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01855-5)
- Schweimer, J., & Hauber, W. (2005). Involvement of the rat anterior cingulate cortex in control of instrumental responses guided by reward expectancy. *Learning and Memory*, 12(3), 334–342. <https://doi.org/10.1101/lm.90605>
- Segovia, S., & Guillamón, A. (1993). Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway and sex differences in reproductive behaviors. *Brain Research Reviews*, 18(1), 51–74. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(93\)90007-M](https://doi.org/10.1016/0165-0173(93)90007-M)
- Shipman, M. L., Trask, S., Bouton, M. E., Green, J. T. (2018). Inactivation of prelimbic and infralimbic cortex respectively affects minimally-trained and extensively-trained goal-directed actions. *Neurobiology of Learning and Memory*, 155, 164–172. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.07.010>
- Silveira, M. C. L., Sandner, G., Graeff, F. G. (1993). Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. *Behavioural Brain Research*, 56(1), 115–118. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(93\)90028-O](https://doi.org/10.1016/0166-4328(93)90028-O)
- Simerly, R. B., Swanson, L. W., Gorski, R. A. (1985). The distribution of monoaminergic cells and fibers in a periventricular preoptic nucleus involved in the control of gonadotropin release: Immunohistochemical evidence for a dopaminergic sexual dimorphism. *Brain Research*, 330(1), 55–64. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)90007-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)90007-1)
- Simerly, R. B., Zee, M. C., Pendleton, J. W., Lubahn, D. B., Korach, K. S. (1997). Estrogen receptor-dependent sexual differentiation of dopaminergic neurons in the preoptic region of the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(25), 14077–14082. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.14077>

- Singh J., Verma I. C. (1987). Influence of major histo(in)compatibility complex on reproduction. *American Journal of Reproductive Immunology and Microbiology*, 15(4):150–152.
- Skorska, M. N., & Bogaert, A. F. (2020). Fraternal Birth Order, Only-Child Status, and Sibling Sex Ratio Related to Sexual Orientation in the Add Health Data: A Re-analysis and Extended Findings. *Archives of Sexual Behavior*, 49(2), 557–573 <https://doi.org/10.1007/s10508-019-01496-x>
- Smith J. W., Seckl J. R., Evans A. T., Costall B., Smythe J. W. (2004). Gestational stress induces post-partum depression-like behaviour and alters maternal care in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 29(2): 227–244. [http://doi.org/10.1016/S0306-4530\(03\)00025-8](http://doi.org/10.1016/S0306-4530(03)00025-8).
- Sommer, V., & Vasey, P. L. (2006). Homosexual behaviour in animals: An evolutionary perspective. Cambridge University Press.
- Stark, C. P., Alpern, H. P., Fuhrer, J., Trowbridge, M. G., Wimbish, H., Smock, T. (1998). The medial amygdaloid nucleus modifies social behavior in male rats. *Physiology & Behavior*, 63(2):253-9. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(97\)00438-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(97)00438-1)
- Swaab D. F., & Hofman M. A., (1990). An enlarged suprachiasmatic nucleus in homosexual men. *Brain Research*, 537(1-2) 141-148. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90350-k](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90350-k)
- Szuran, T. F., Pliska, V., Pokorny, J., Welzl, H. (2000). Prenatal stress in rats: Effects on plasma corticosterone, hippocampal glucocorticoid receptors, and maze performance. *Physiology & Behavior*, 71(3-4), 353–362. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(00\)00351-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(00)00351-6)
- Takahashi, L. K., Haglin, C., Kalin, N. H. (1992). Prenatal stress potentiates stress-induced behavior and reduces the propensity to play in juvenile rats. *Physiology & Behavior*, 51(2), 319–323. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(92\)90147-T](https://doi.org/10.1016/0031-9384(92)90147-T)
- Uylings, H. B. M., Groenewegen, H. J., Kolb, B. (2003). Do rats have a prefrontal cortex? *Behavioural Brain Research*, 146(1–2), 3–17. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.09.028>
- VanRyzin, J. W., Yu, S. J., Perez-Pouchoulen, M., McCarthy, M. M. (2016). Temporary Depletion of Microglia during the Early Postnatal Period Induces Lasting Sex-Dependent and Sex-Independent Effects on Behavior in Rats. *ENeuro*, 3(6), <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0297-16.2016>
- Vasey P. L. (2002). Same-sex sexual partner preference in hormonally and neurologically unmanipulated animals. *Annual Review of Sex Research*, 13:141–179.

- Ventura-Aquino, E., & Paredes, R. G. (2017). Animal Models in Sexual Medicine: The Need and Importance of Studying Sexual Motivation. *Sexual medicine reviews*, 5(1), 5–19. <https://doi.org/10.1016/j.sxmr.2016.07.003>
- Vom Saal, F. S. (1981). Variation in phenotype due to random intrauterine positioning of male and female fetuses in rodents. *Journal of Reproduction and Fertility*, 62(2), 633–650. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0620633>
- Wallen, K., & Parsons, W. A. (1997). Sexual behavior in same-sexed nonhuman primates: is it relevant to understanding human homosexuality? *Annual Review of Sex Research*, 8, 195–223
- Wang, C. T., Shui, H. A., Huang, R. L., Tai, M. Y., Peng, M. T., Tsai, Y. F. (2006). Sexual motivation is demasculinized, but not feminized, in prenatally stressed male rats. *Neuroscience*, 138(2), 357–364. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.11.026>
- Ward I. L., (1972). Prenatal stress feminizes and demasculinizes the behavior of males. *Science*, 175(82):687-688.
- Watabe-Uchida, M., Zhu, L., Ogawa, S. K., Vamanrao, A., Uchida, N. (2012). Whole-Brain Mapping of Direct Inputs to Midbrain Dopamine Neurons. *Neuron*, 74(5), 858–873. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.017>
- Weinstock, M. (2001). Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. *Progress in Neurobiology*, 65(5), 427–451. [http://doi.org/10.1016/S0301-0082\(01\)00018-1](http://doi.org/10.1016/S0301-0082(01)00018-1)
- Weinstock, M. (2007). Gender differences in the effects of prenatal stress on brain development and behaviour. *Neurochemical Research*, 32(10), 1730–1740. <https://doi.org/10.1007/s11064-007-9339-4>
- Weisz, J., Brown, B. L., Ward, I. L. (1982). Maternal stress decreases steroid aromatase activity in brains of male and female rat fetuses. *Neuroendocrinology*, 35(5), 374–379. <https://doi.org/10.1159/000123410>
- Weisz, J., & Ward, I. L. (1980). Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring. *Endocrinology*, 106(1), 306–316. <https://doi.org/10.1210/endo-106-1-306>
- Weller A., Glaubman H., Yehuda S., Caspy T., Ben-Uria Y. (1988). Acute and repeated gestational stress affect offspring learning and activity in rats. *Physiology & Behavior*, 43 (2): 139–143. [http://doi.org/10.1016/0031-9384\(88\)90229-6](http://doi.org/10.1016/0031-9384(88)90229-6).
- West, C. H. K., Clancy, A. N., Michael, R. P. (1992). Enhanced responses of nucleus accumbens neurons in male rats to novel odors associated with sexually

receptive females. *Brain Research*, 585(1-2), 49–55.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)91189-L](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)91189-L)

WHO. (2006). *Defining sexual health: report of a technical consultation on sexual health, 28-31 January 2002, Geneva*: World Health Organization Press. 35pp.

Winstanley, C. A., Theobald, D. E. H., Cardinal, R. N., Robbins, T. W. (2004). Contrasting roles of basolateral amygdala and orbitofrontal cortex in impulsive choice. *Journal of Neuroscience*, 24(20), 4718–4722.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5606-03.2004>

Wood, R. I. (1997). Thinking about networks in the control of male hamster sexual behavior. *Hormones & Behavior*, 32(1), 40–45.
<https://doi.org/10.1006/hbeh.1997.1403>

Wu M. V., Manoli D. S., Fraser E. J., Coats J. K., Tollkuhn J., Honda S. I., Shah N. M. (2009). Estrogen masculinizes neural pathways and sex-specific behaviors. *Cell*, 139(1):61–72. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.036>.

Xu X., Coats J. K., Yang C. F., Wang A., Ahmed O. M., Alvarado M., Shah N. M. (2012). Modular genetic control of sexually dimorphic behaviors. *Cell*, 148(3):596–607. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.018>.

Yamaguchi, S., Abe, Y., Maejima, S., Tsukahara, S. (2018). Sexual experience reduces neuronal activity in the central part of the medial preoptic nucleus in male rats during sexual behavior. *Neuroscience Letters*, 685, 155–159. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.08.037>

Zeeb, F. D., Baarendse, P. J. J., Vanderschuren, L. J. M. J., Winstanley, C. A. (2015). Inactivation of the prelimbic or infralimbic cortex impairs decision-making in the rat gambling task. *Psychopharmacology*, 232(24), 4481–4491. <https://doi.org/10.1007/s00213-015-4075-y>

Anexo

Trabajos derivados de esta tesis

- Hernández González A. y Fernandez-Guasti A. Influence of maternal multiparity and gestational stress in sexual preference of the male progeny. **Ganador del mejor trabajo de estudiante de doctorado** en el marco del *45th Workshop on: “Sex Differences, Dimorphisms, Divergences: Impact on Brain and Behavior in Health and Disease”* . Erice, Sicilia, Italia. Mayo 2019.
- Hernández González A. y Fernandez-Guasti A. Influence of maternal conditions on sexual preference of the male progeny in rats. **Premio al mejor trabajo de estudiante 2019** en la *Reunión de la International Academy of Sex Research (IASR)*. CDMX, México. Julio 2019.
- Publicación de un **artículo en colaboración** relacionado con el tema: Olvera-Hernández, S., Hernández, A., Reyes, R., Fernández-Guasti, A. Establishment of partner preference in male rats: Effect of prenatal letrozole and sexual experience. *Hormones & Behavior*, 2019, 109, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2019.02.009>



Lack of interaction between prenatal stress and prenatal letrozole to induce same-sex preference in male rats

Alejandra Hernández^a, Sandra Olvera-Hernández^b, Alonso Fernández-Guasti^{a,*}

^a Pharmacobiology Department, Center of Research and Advanced Studies of IPN (CINVESTAV), México.

^b Medical and Psychology School, Autonomous University of Baja California, Tijuana, B.C., México.

ARTICLE INFO

Keywords:

Partner preference
Prenatal stress
Letrozole
Aromatase
Same-sex
Rat sexual behavior

ABSTRACT

Same-sex partner preference between males has been observed in all species in which this behavior has been studied. Disruption of brain estradiol synthesis during development has been proposed as one of the biological causes underlying this behavior in some mammals. In support of this possibility, perinatal administration of aromatase inhibitors (such as letrozole) to male rat pups, induces around half of them to have same-sex preference and female sexual behavior in adulthood. Another putative factor that modifies sex preference is prenatal stress. Several stress protocols, applied to the pregnant dam, cause some of the adult male progeny to have an increased male preference, a decreased preference for the female, and lordosis behavior. Interestingly, these effects of stress might be mediated by its inhibitory action on brain aromatase. The aim of the present study was to analyze a possible interaction between these two factors in male rats. Pregnant dams were exposed to one of the four treatments across gestation days 10–22 (G10–G22): 1) vehicle-treated non-stressed controls; 2) letrozole (0.56 µg/kg); 3) 30 min immobilization stress; 4) both letrozole and stress combined. The male offspring were tested in adulthood for partner preference in a three-chambered arena, where we also recorded the masculine and feminine sexual behaviors. One week later males were tested for masculine and feminine sexual behavior in cylindrical arenas where they interacted for 30 min with a receptive female and thereafter with a sexually active male for another 30 min. Letrozole, stress and their combination resulted in same-sex preference in 40, 31 and 50% of males, respectively, compared to 5% in the control group. In the sexual behavior tests, prenatal stress reduced the percentage of males displaying intrusions and ejaculation (impaired masculinization), while letrozole mainly increased lordosis (impaired defeminization). The males prenatally submitted to stress and treated with letrozole presented these behavioral features but did not differ from both treatments given independently. The results indicate that the changes induced by stress or the aromatase inhibition produced by letrozole only accounts for a shift in partner preference in around half of the males and that there was no interaction between these two factors.

1. Introduction

Sexual preference refers to the sexual attraction of an animal to a partner of the same or opposite sex when given a choice [1]. Most males prefer to have sexual interactions with females, while receptive females generally select males for sexual contacts. Nevertheless, in several species, there is a subpopulation of around 5% of males that prefer to have sexual interactions with other males [2,3]. In animals, the possible factors underlying same-sex preference include prenatal stress [4,5], endocrine modifications during early development [6,7] and postnatal environmental manipulations such as conditioning or the execution of masculine sexual behavior [8,9]. Although human homosexuality cannot be equated to same-sex preference in animals, because of the

former's important psychological component [2,3,10], several physiological factors have been proposed to underlie human homosexuality, such as: specific DNA sequences in the X chromosome [11], fraternal birth order [12–14], epigenetic factors [15,16] and – controversially – prenatal stress [5,17–20]. These studies have led to the idea that same-sex preference does not have a single cause, but instead is determined by a complex interplay of different biological factors acting on distinct population subgroups [2,21,22].

The fetal mammalian brain develops in the male direction if exposed to testosterone during critical stages of development, while female brain development occurs in the absence of this hormone surge [23]. The source of fetal testosterone is the Leydig cells of the testes that are active prenatally [24,25]. In various species the sexual

* Corresponding author: Calz. de los Tenorios No. 235, Col. Granjas Coapa, México 14330, CDMX, México.

E-mail address: jfernand@cinvestav.mx (A. Fernández-Guasti).

<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113042>

Received 14 February 2020; Received in revised form 12 June 2020; Accepted 28 June 2020

Available online 30 June 2020

0031-9384/© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

differentiation process also occurs during the first postnatal hours to days after birth [26–28] and may extend into the pubertal period [29]. In rodents, estrogen formed from testosterone in the brain through aromatization is required for full masculinization and defeminization [30–33]. In rams and rodents, alterations in the endocrine milieu during development leads to changes in partner preference [6,7,27,30,34,35]. For example, the perinatal administration of the aromatase inhibitors, ATD (1,4,6-androstatriene-3,17-dione) or ADT (androst-4-ene-3,6,17-trione) induced same-sex preference in some, but not all, male rats (evaluated in the three compartment preference test) [7,27]. The recent use of the more selective non-steroidal aromatase inhibitor, letrozole, confirmed this idea [6,34,36]: prenatal administration (0.56 µg/kg, G10-G22) of letrozole resulted in around half of the exposed males displaying as adults same sex preference, penile erections when exposed to another male, and lordosis, which is a female typical behavior [6,34,36]. Remarkably, lower doses of letrozole (0.10, 0.31 µg/kg) lacked an effect, while higher ones (1.0 µg/kg, G10-G22) precluded parturition [6]. These data suggest that changes in perinatal estrogen levels alter the development of sexual preference in approximately half of the individuals.

The process of sexual brain differentiation can also be disrupted by exposing mothers of various species to stress during pregnancy. Thus, adult male rat offspring from prenatally stressed mothers exhibit diminished male sexual behavior and enhanced female receptive behavior (lordosis) [37]. These behavioral changes were explained by reduced aromatase activity and testosterone levels during the critical period of sexual differentiation [24,38]. With respect to partner preference, prenatally stressed male rats and mice showed a reduced female preference and an increased male preference in the three-compartment and in odor preference tests [4,39,40]. However, these studies did not report the proportion of males that displayed same-sex preference. Thus, from published studies it is unclear whether stress affects sexual development of all or of a subpopulation of males.

Moreover, it is unknown whether prenatal stress might interact with the pharmacological inhibition of aromatase activity, having additive or synergistic effects on the development of partner preference behavior. The aim of the present study was to experimentally address this question. We hypothesized that the combination of prenatal stress and pharmacological inhibition of aromatase activity, by letrozole administration, would increase both the proportion of males with same-sex preference and the proportion that display feminine sexual behavior, compared to either treatment alone.

2. Materials and methods

2.1. Animals

For this study Wistar rats were used ($n = 130$). The number of experimental males was 88, while the remaining males and females were used as stimuli in the different tests. All animals were housed in a room with an inverted dark light cycle with lights off at 10:00, controlled humidity ($55 \pm 10\%$), temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), and access to water and food *ad libitum*. All animals were manipulated in accordance with the Mexican Official Norm of use and care of laboratory animals "NOM-062-ZOO-1999" and approved by the local ethics committee (CICUAL-Cinvestav).

2.2. Prenatal letrozole treatment

The protocol followed for applying this aromatase inhibitor was the same as previously described [6,34,36,41]. Briefly, female rats in natural proestrus were allowed to copulate with a sexually expert male until two ejaculations were displayed; this day was considered as gestational day 0 (G0). The presence of spermatozoa in a vaginal smear was verified. Pregnant rats received letrozole (0.56 µg/kg/ml s.c) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, dissolved in corn oil) from day 10 of

pregnancy until one day before delivery (G22). On the day of birth, the litter was adjusted to 4–5 males and 4–5 females (an approximate litter size of 10). At 21 days of age, animals were weaned and only males were selected and housed in a cage with 4–5 rats of the same litter and treatment. Rats were maintained without further manipulation and tested at 3 months of age ($n = 30$). Control animals ($n = 21$) came from mothers that were injected with vehicle (corn oil) between days G10 to G22.

2.3. Gestational stress protocol

To induce stress in pregnant females, we followed a protocol of daily restraint using Plexiglas immobilizers during 30 min from gestational day 10 until one day before delivery [4]. Litters were adjusted as described above. Pups were weaned at 21 days of age and only males were conserved. Males cohabitated in cages of 4–5 animals of the same litter and received no further manipulation until they reached the age of three months ($n = 19$).

2.4. Letrozole plus prenatal stress

To evaluate the effect of both treatments given concurrently (letrozole treatment and restraint stress), the pregnant females received letrozole (0.56 µg/kg/ml s.c) and daily restraint stress (applied after receiving the letrozole injection) in a Plexiglas tube for 30 min from G10 until one day before delivery (G22). As previously stated, the litters were adjusted to half males and half females and the pups were weaned at 21 days of age. Males cohabitated in cages of 4–5 animals of the same litter and remained unhandled until reaching three months of age ($n = 18$).

2.5. Partner preference test

To determine partner preference, a three-compartment box ($60 \times 30 \times 40$) was used as described by Brand [27]. The test was conducted under dim red light during the early dark phase of the light–dark cycle (between noon and 16:00 h). The advantage of this test is that males can freely choose between two different stimuli (sexually experienced male vs. receptive female; [22]). In the lateral compartments of the box were placed either a fully receptive female [ovariectomized and sequentially treated with estradiol benzoate (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, 10 µg/rat) 24 h before the test, followed by progesterone (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, 2 mg/rat) 4 h previous to the trial] or a sexually experienced male (with ejaculation latencies shorter than 15 min in three consecutive tests). These stimulus animals were tied with a harness that limited their movement. In the central compartment (neutral) the experimental male was placed (5 min of habituation) and its sexual interaction time with each stimulus for 15 min was used to determine partner preference (see [36]). Interaction was considered as all approximations to either of the stimulus animals, including sexual behaviors as mounts, intromissions or ejaculations, proceptive behaviors (ear wiggling, hoping and darting, for definitions see [42]) and lordosis. A preference index was obtained by dividing the time interacting with the receptive female between the time interacting with the experienced male; same-sex preference was considered when the males had an index value equal or less than 0.89 (which means that the experimental male spent more time interacting with the male than with female). This limit value was set up because it reveals a clear male preference and has been previously used to establish same-sex preference in rats [9]. Applying this criterion, the percentage of males with same-sex preference was determined in each group. With the female we calculated the percentage of males displaying mounts, intromissions and ejaculation and their median number. With the male we calculated the percentage and number of mounts that the experimental male did and received from the stimulus male and the percentage of animals displaying lordosis [6]. All behaviors in the tests were videotaped for

later analyses using The Observer 5.0 (Noldus®).

2.6. Sexual behavior test

One week after the partner preference test, animals were placed in a circular arena (52 cm diameter and 45 cm high) in order to evaluate sexual behavior. Experimental males were located in the arena containing a receptive female (induced by the sequential administration of estradiol benzoate and progesterone before the test, *vide supra*). In this test we registered the percentage of males displaying mounts, intromissions and ejaculation and their median number [43]. After 30 min, the female was withdrawn and the experimental subject remained in the arena for 5 min, then, a sexually experienced male was introduced and allowed to interact with the experimental male during another 30 min. With the stimulus male we registered the percentage and the number of mounts that the experimental male did and received from the stimulus male [6], as well as the percentage of experimental males showing lordosis [42] and the lordosis quotient (number of lordosis/number of mount X 100) of those animals that displayed this behavior. All tests were video recorded.

2.7. Statistical analysis

To analyze proportions a Fisher Exact test was performed. In order to examine the time interacting with the preferred stimuli, a One-Way ANOVA was used with a *post hoc* Tukey test. A Kruskal Wallis test followed by the Mann Whitney U test was performed to evaluate the number of sexual behaviors displayed when facing the female or the male and the lordosis quotient. Results with a $p < 0.05$ value were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Partner preference

In the control group, only 5% of the males presented male preference spontaneously (1 out of 21). By contrast, twelve out of thirty (40%) prenatally letrozole-treated males showed same-sex preference, whereas in the prenatally stressed males, 6 out of 19 (31%) had same-sex preference. This percentage was increased to 50% (9/18) in the group of males with the combined treatment, (prenatal letrozole plus stress; Table 1). Although the proportions of males that showed same-sex preference were significantly increased in all 3 experimental groups compared to control (Fisher Exact test; $p < 0.05$, $p < 0.01$), in the combined treatment group (letrozole plus stress) this proportion was not significantly increased compared to either treatment alone. Interestingly, in the groups submitted to stress or to stress plus prenatal letrozole, 16% and 5% of animals, respectively, did not interact with either of the stimuli (Table 1) and spent the entire test time (15 min) in

Table 1

Percentage of males with female preference, male preference and that did not interact with the stimuli in the three compartment test after prenatal letrozole, prenatal stress or the combination of treatments (proportions in parentheses).

	Partner preference		
	Males with female preference	Males with male preference	Males that did not interact
Control	95% (20/21)	5% (1/21)	0% (0/21)
LET	60% ** (18/30)	40% ** (12/30)	0% (0/30)
Stress	53%* (10/19)	31%* (6/19)	16% (3/19)
Stress + LET	45%** (8/18)	50%** (9/18)	5% (1/18)

Fisher Exact test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. control.

the central compartment. These animals were omitted from further behavioral analyses.

Fig. 1 shows the time that males spent interacting with their preferred stimuli. Males showing a female preference (as defined above, and shown in Table 1) and those that showed a male preference are plotted separately. Since only one control male showed a male preference (Table 1), no mean could be calculated and therefore Fig. 1 shows only data for the 20 control males that displayed a female preference (black bar). In the subset of males that were prenatally treated with letrozole plus stress and that showed a female preference (dotted bars; $n = 8$; see Table 1;) there was a reduction in the time they spent interacting with the receptive female, compared to the control treatment (Fig. 1; One way ANOVA $F_{(3,52)} = 4.32$; $p = 0.01$, Tukey T test, $p < 0.05$). Likewise, in both subsets of males prenatally treated with stress (stress alone and letrozole plus stress; dashed and dotted bars, respectively) and that showed a male preference ($n = 6$ and $n = 9$, respectively; see Table 1), there was a significant reduction in the interaction time with the stimulus male, compared with those that received letrozole alone (Fig. 1; One way ANOVA $F_{(2,24)} = 7.3$; $p = 0.001$, Tukey T test, $p < 0.01$). Thus, while letrozole treatment alone increased the proportion of males that showed a male preference, prenatal stress alone and/or combined with letrozole both increased the proportion of males that showed a male preference (Table 1), as well as decreased the duration spent with either the male or the female stimulus animal (Fig. 1).

When sexual behavior was evaluated in the partner preference test, we found that around half of the males of the control group (57%) displayed mounts towards the receptive female and 38% towards the stimulus male (table 2). These percentages were significantly reduced only in the group of the combined treatment (stress plus letrozole) where only one of the males (6%) mounted the receptive female or the stimulus male (Fisher Exact test; $p < 0.05$), however, this low percentages did not differ from those found in the independent treatments. No animal of the combined prenatal treatment with letrozole plus stress displayed intromission; this proportion differed exclusively from that of control males (33%). In the control group no male was mounted by the stimulus male, while 23% of males of the combined treatment were mounted by the stimulus male (Fisher Exact test; $p < 0.05$). This percentage, however, did not differ from the treatments given independently.

There were no differences in the median number of mounts emitted to the male or to the female or received from the stimulus male between the groups (data not shown). Interestingly, there was a reduced number of intromissions in both stressed groups when compared with the letrozole treated group (Kruskal Wallis; $H_{(3)} = 14.93$ $p = 0.001$, Mann Whitney U test, $p < 0.05$), but not *versus* the control (data not shown). A single subject from the control group ejaculated during the partner preference test, that as aforementioned lasted for 15 min; and only one animal of the stress group and of the letrozole plus stress group showed lordosis when mounted by the male. No statistical differences in these parameters were found between groups (data not shown).

3.2. Sexual behavior

Table 3 summarizes the results of the sexual behavior tests (30 min in duration) performed in a cylindrical arena with a single stimulus individual (first a female, then a male; see Methods). The table shows the percentage of males that displayed masculine or feminine sexual behavior, and the median number of mounts and intromissions emitted by the males towards the receptive female, as well as the LQ of those males that showed at least one receptive behavior when mounted by the stimulus male.

Sexual behavior with the receptive female. There were no differences in the percentage of males displaying mounts between the groups (70–90%), but the median number of mounts was significantly reduced in both stressed groups (Kruskal Wallis; $H_{(3)} = 17.1$, $p = 0.0007$; Mann

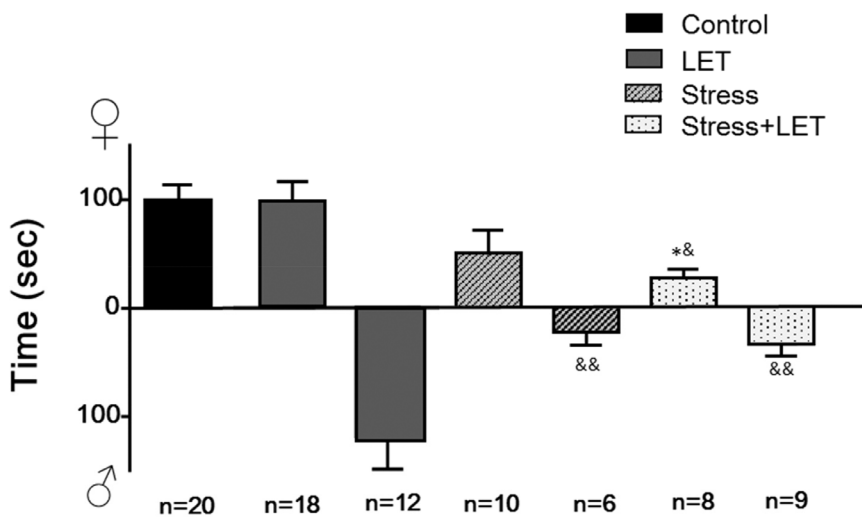


Fig. 1. Time spent interacting with the preferred stimuli in males prenatally exposed (between G10-G22) to letrozole, stress and the combination of these treatments. Upward values indicate female preference and downward values male preference. For One-way ANOVA results see text. The number of animals per group are shown below each bar. Tukey T test, * $p < 0.05$ vs. control, & $p < 0.05$ vs. LET with female preference; && $p < 0.01$ vs. LET with male preference.

Table 2

Sexual behavior in the partner preference test. Table shows percentages (proportions in parentheses) of males showing mounts or intromissions to the receptive female and mounts received or emitted to the stimulus male.

	Mounting the receptive female	Intromitting the receptive female	Mounting the stimulus male	Receiving mounts from the stimulus male
Control	57% (12/21)	33% (7/21)	38% (8/21)	0% (0/21)
LET	43% (13/30)	37% (11/30)	30% (9/30)	16% (5/30)
Stress	25% (4/16)	6% (1/16)	19% (3/16)	6% (1/16)
Stress + LET	6%* (1/17)	0%* (0/17)	6%* (1/17)	23%* (4/17)

Fisher Exact test, * $p < 0.05$.

Whitney U test, $p < 0.01$, compared with controls). By contrast, there was a reduction in the proportion of males displaying intromission in the stressed group (Fisher Exact test, $p < 0.05$, compared with the control). In the stress plus letrozole group, the percentage of males displaying intromission was also significantly decreased when compared to the control (Fisher Exact test, $p < 0.01$) and the letrozole group (Fisher Exact test, $p < 0.05$). Consistently, the number of intromissions during the 30 min test was also reduced (Kruskal Wallis; $H_{(3)} = 14.64$, $p = 0.002$): few intromissions were observed in either of the stressed groups (Mann Whitney U test, $p < 0.001$ and $p < 0.01$, compared to

control animals), and in the group submitted to stress and letrozole such reduction was also statistically different when compared with the letrozole alone group (Mann Whitney U test, $p < 0.05$). The number of males that reached ejaculation was also lower in both stressed groups (alone and in combination with letrozole, Fisher Exact test, $p < 0.01$). Thus, the masculine sexual behavior displayed by prenatally stressed males was similar independently of whether or not they received letrozole treatment.

Sexual behavior with the stimulus male. Almost all (94%) stressed plus letrozole-treated males mounted the stimulus male. This percentage differed from that found in controls (59%) and in letrozole-treated males (67%, Fisher Exact test, $p < 0.05$ for both), but not from prenatally stressed animals (88%). Neither the percentages of subjects that received mounts from the stimulus male (59–75%) nor the number of mounts differed between the groups (data not shown). However, as previously reported [6,44–46], none of the control males showed lordosis when mounted by the stimulus male, however, this typical feminine behavior was observed in all three treated groups (Table 3). The percentage of males displaying lordosis in the group that received letrozole plus stress (35%) did not differ from the percentages of males showing this behavior after receiving either of these treatments alone (33 and 25%). There was a difference between the treated groups in the lordosis quotient of those males that displayed this behavior: the stressed males consistently had lower LQs (40) than those prenatally treated with letrozole alone (89) or letrozole in combination with stress (85) (Kruskal Wallis; $H_{(2)} = 9.06$; $p = 0.005$). Paired comparisons showed that the combined treatment (stress plus letrozole) showed a trend toward a significant increase in LQ compared to the stress

Table 3

Masculine and feminine sexual behavior of males prenatally treated with letrozole (LET), submitted to stress (Stress) and the combination of treatments (Stress + LET).

	Masculine behavior			Feminine behavior			
	% of animals showing mounts	Median of mounts	% of animals showing intromissions	Median of intromissions	% of animals showing ejaculation	% of animals showing lordosis	Lordosis Quotient
Control	90% (19/21)	18	81% (17/21)	11	43% (9/21)	0% (0/21)	–
LET	77% (23/30)	14	67% (20/30)	9	17% (5/30)	33% (10/30)	89
Stress	75% (12/16)	7**	44%* (7/16)	3***	0% ** (0/16)	25% (4/16)	40&&&
Stress + LET	70% (12/17)	7*:&&&	29%*:&& (5/17)	4** &	0% ** (0/17)	35% (6/17)	85 ⁺

Percentages were compared using the Fisher Exact test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. control; & $p < 0.05$ vs. LET. Number of events and lordosis quotient were analyzed by the Kruskal Wallis ANOVA (for details see text) followed by the Mann Whitney U test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. control; & $p < 0.05$; &&& $p < 0.001$ vs. LET; ⁺ $p = 0.056$ vs. Stress.

treatment alone (Mann Whitney U test, $p = 0.056$), while the combined treatment did not differ significantly from letrozole alone.

4. Discussion

The principal prediction of the present study was that the effect of letrozole treatment on partner preference would be increased by prenatal stress; that is, that these two factors would sum to produce larger effects. The present results failed to show an interaction between these factors.

Our first observation was that stress and aromatase inhibition (by letrozole treatment), given independently, induced changes in partner preference. In agreement with previous reports, where prenatal stress modified the sex preference measured in odor or partner tests [4,39], we found that immobilization stress applied to the pregnant dam produced male offspring that when adults had a reduced preference for sexually receptive females. Using another stress protocol and a different species (Swiss Webster mice), Meek et al., 2006 [4] reported similar results when the animals were tested in the three-compartment partner preference test. Also, in line with the data indicating that gestational stress impairs cognitive abilities [47-48], particularly sociability [49], we found that a few males whose mothers were stressed did not interact with any of the stimuli, remaining the whole test in the middle neutral compartment. Furthermore, in the stressed groups the interaction time with the preferred stimulus was reduced (see Fig. 1). When prenatally stressed males were forced to interact with a sexually receptive female (in a cylindrical arena), we found a low proportion of these males displaying intromissions and ejaculations, accompanied by a reduction in the number of mounts and intromissions, indicating an altered masculinization process [50]. In addition, when these males were tested with an active male, there was an increase in the percentage of subjects showing lordosis, indicating that defeminization was also altered [51]. These findings are in line with previous data using diverse prenatal stressors [4,37,39] and reinforce the idea that stress impairs masculinization and defeminization [31,37,52].

The results obtained with prenatal letrozole-treatment agree with previous reports showing that 30–40% of males prenatally treated with letrozole displayed same-sex preference [6,9,34,36]. All males prenatally treated with this aromatase inhibitor interacted with a preferred stimulus (either male or female) and their interaction time with their preferred partner was higher than that shown by animals submitted prenatally to stress (Fig. 1). Also, in line with previous findings [6], we observed that masculine sexual behavior remained unmodified by prenatal letrozole treatment, while the percentage of males displaying lordosis was increased (33%) and those animals that displayed this behavior had high lordosis quotients (LQ=89). These results, taken together, suggest that prenatal letrozole treatment primarily alters the process of defeminization [6]. Interestingly, in the sexual behavior test, the combined treatment of letrozole plus stress produced a behavioral profile of males with an impaired defeminization (preserved feminine sexual behavior) due to letrozole treatment, as well as impaired masculinization (reduced male sexual behavior) most likely due to stress.

In no parameter of the partner preference test the male offspring of dams submitted to stress and injected with letrozole differed from both treatments given independently, indicating a lack of interaction between these two factors. Interestingly, in some parameters, the effect of prenatal stress prevailed in the group submitted to the combination of treatments. For example, both stressed groups showed a reduction in the interaction time with the preferred stimulus (either male or female), making possible to propose that this manipulation decreased the motivation to interact socially with any individual, female or male. Wang et al. (2006) [40] evaluated the motivation of prenatally stressed males and found a reduction in the visits and time spent nearby the female, without an increase in the time or visits to male area, suggesting decreased masculinization [51], but not a feminization of the sexual motivation. The precise mechanisms underlying such reduced

sociability are unknown, but may be related to the reduction in oxytocinergic and vasopressinergic neurons in the progeny of stressed dams [53,54]. Previously, we demonstrated that males prenatally treated with letrozole had an increase in non-contact penile erections when exposed to a sexually experienced male [6], a finding indicating an increased sexual motivation of letrozole-treated males towards same-sex subjects. Considering these results, it would be of interest to determine if the combination of stress plus letrozole alters sexual motivation in specific tests [55,56]. One of the main advantages of using the three-compartments test to determine partner preference, is that it permits the evaluation of sexual behaviors [6,22]. Applying this test, we found a reduction in the number of males displaying mounts (to both, the male and the female) and intromissions in the group that prenatally received letrozole plus stress. Likewise, in the 30 min sexual behavior test, where the males had access only to the female in a cylindrical arena, a similar inhibitory effect was observed of the combined treatment. However, these parallel effects were not always consistent; for example, in the three-compartment partner preference test we found a higher proportion of animals -treated with letrozole plus stress- that received mounts from the stimulus male (inviting to propose a higher attractiveness of these subjects), this difference, though, was not observed when they were tested in the cylindrical arena with the stimulus male. As previously discussed [9] these variations most likely rely on the diverging testing conditions.

It could be argued that the lack of interaction between prenatal letrozole and stress is due to a ceiling or a floor effect of the treatments given independently. Arguing against this possibility, the shift in partner preference induced by each treatment was between 30 and 40%, leaving a wide window to observe putative letrozole by stress interactions. Such broad window was also observed for the percentage of males showing mounts, intromissions (in both, the partner preference and the sexual behavior tests) and lordosis. However, there was a complete absence of males ejaculating in the stressed groups and close to maximal values of lordosis quotient in the letrozole-group, in these parameters a floor or a ceiling effect could be veiling possible interactions.

As aforementioned, gestational stress interferes with the normal development of the steroidogenic potential of the fetal Leydig cells, altering the testosterone levels at G17–19 [38] and the aromatase activity during G18 and G19, causing a decrease in the amount of estrogen formed in the male fetal brains [57], essential for sexual differentiation [32,33]. These data suggest a common endocrine pathway -aromatase inhibition- mediating the effects of stress and obviously those of letrozole. In other words, the prenatal inhibition of estrogen synthesis (pharmacologically produced by letrozole injection) did not sum to that presumably induced by stress to increase the percentage of males with same-sex preference. This observation suggests that aromatase inhibition (regardless of whether it is induced by stress or pharmacologically) only affects around half of the animals. In support of this possibility, previous data showed that higher doses of letrozole or prolonged treatments with this aromatase inhibitor had no larger effects on the proportion of males with same-sex preference [6,9]. However, other interpretations such as the characteristic polytocus of this species, with different androgen levels depending on the uterine position [58-60], may underlie the variability observed in the same-sex preference of the litters treated with letrozole, stressed and the combination of treatments. In addition, prenatal stress produced large behavioral changes [61,62], including a decreased defeminization, masculinization and sociability reinforcing the notion that this manipulation alters many mechanisms underlying brain differentiation [37,49] and arguing against a single common pathway when combined with letrozole.

Additionally, during development the monoaminergic systems seem to regulate aromatase activity in several brain regions, particularly those related to sexual behavior [63]. Thus, catecholamines diminish brain aromatase *in vitro* [64] acting as a substrate competing

- lordosis by male rats, *Brain Res* 370 (1986) 21–28, [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)91100-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)91100-5).
- [45] M. Kakeyama, K. Yamanouchi, Lordosis in male rats: the facilitatory effect of mesencephalic dorsal raphe nucleus lesion, *Physiol. Behav* 51 (1992) 181–184, [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(92\)90221-M](https://doi.org/10.1016/0031-9384(92)90221-M).
- [46] K. Yamanouchi, Y. Arai, Heterotypical Sexual Behavior in Male Rats: individual Difference in Lordosis Response, *Endocrinol. Jpn* 23 (1976) 179–182, <https://doi.org/10.1507/endocrj1954.23.179>.
- [47] D.R. Kim, T.L. Bale, C.N. Epperson, Prenatal programming of mental illness: current understanding of relationship and mechanisms, *Curr. Psychiatry Rep* 17 (2015) 1–9, <https://doi.org/10.1007/s11920-014-0546-9>.
- [48] A. Charil, D.P. Laplante, C. Vaillancourt, S. King, Prenatal stress and brain development, *Brain Res. Rev* 65 (2010) 56–79, <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2010.06.002>.
- [49] V. Patin, B. Lordi, A. Vincent, J. Caston, Effects of prenatal stress on anxiety and social interactions in adult rats, *Dev. Brain Res* 160 (2005) 265–274, <https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2005.09.010>.
- [50] B.M. Nugent, C.L. Wright, A.C. Shetty, G.E. Hodes, K.M. Lenz, A. Mahurkar, S.J. Russo, S.E. Devine, M.M. McCarthy, Brain feminization requires active repression of masculinization via DNA methylation, *Nat. Neurosci* 18 (2015) 690–697, <https://doi.org/10.1038/nn.3988>.
- [51] C.L. Henley, A.A. Nunez, L.G. Clemens, Hormones of choice: the neuroendocrinology of partner preference in animals, *Front. Neuroendocrinol* 32 (2011) 146–154, <https://doi.org/10.1016/j.yfrme.2011.02.010>.
- [52] D.K. Anderson, R.W. Rhee, D.E. Fleming, Effects of prenatal stress on differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area (SDN-POA) of the rat brain, *Brain Res* 332 (1985) 113–118, [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)90394-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)90394-4).
- [53] M.A. De Souza, L.A. Centenaro, P.R. Menegotto, T.P. Henriques, J. Bonini, M. Achaval, A.B. Lucion, Prenatal stress produces social behavior deficits and alters the number of oxytocin and vasopressin neurons in adult rats, *Neurochem. Res* 38 (2013) 1479–1489, <https://doi.org/10.1007/s11064-013-1049-5>.
- [54] P.R. Lee, D.L. Brady, R.A. Shapiro, D.M. Dorsa, J.I. Koenig, Prenatal stress generates deficits in rat social behavior: reversal by oxytocin, *Brain Res* 1156 (2007) 152–167, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.04.042>.
- [55] H.A. Hurtazo, R.G. Paredes, A. Ágmo, Inactivation of the medial preoptic area/ anterior hypothalamus by lidocaine reduces male sexual behavior and sexual incentive motivation in male rats, *Neuroscience* 152 (2008) 331–337, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.10.063>.
- [56] A. Ágmo, Unconditioned sexual incentive motivation in the male Norway Rat (*Rattus norvegicus*), *J. Comp. Psychol.* 117 (2003) 3–14, <https://doi.org/10.1037/0735-7036.117.1.3>.
- [57] J. Weisz, B.L. Brown, I.L. Ward, Maternal stress decreases steroid aromatase activity in brains of male and female rat fetuses, *Neuroendocrinology* 35 (1982) 374–379, <https://doi.org/10.1159/000123410>.
- [58] F.S. Vom Saal, Variation in phenotype due to random intrauterine positioning of male and female fetuses in rodents, *J. Reprod. Fertil.* 62 (1981) 633–650, <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0620633>.
- [59] K.A. McLaurin, C.F. Mactutus, Polytocus focus: uterine position effect is dependent upon horn size, *Int. J. Dev. Neurosci* 40 (2015) 85–91, <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2014.11.001>.
- [60] M. Pei, K.I. Matsuda, H. Sakamoto, M. Kawata, Intrauterine proximity to male fetuses affects the morphology of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in the adult rat brain, *Eur. J. Neurosci* 23 (2006) 1234–1240, <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04661.x>.
- [61] M. Weinstock, Gender differences in the effects of prenatal stress on brain development and behaviour, *Neurochem. Res* 32 (2007) 1730–1740, <https://doi.org/10.1007/s11064-007-9339-4>.
- [62] L.K. Takahashi, C. Haglin, N.H. Kalin, Prenatal stress potentiates stress-induced behavior and reduces the propensity to play in juvenile rats, *Physiol. Behav* 51 (1992) 319–323, [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(92\)90147-T](https://doi.org/10.1016/0031-9384(92)90147-T).
- [63] J. Balthazart, G.F. Ball, New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase), *Trends Neurosci* 21 (1998) 243–249, [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(97\)01221-6](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(97)01221-6).
- [64] M. Jimbo, K. Okubo, Y. Toma, Y. Shimizu, H. Saito, T. Yanaihara, Inhibitory effects of catecholamines and maternal stress on aromatase activity in the fetal rat brain, *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 24 (1998) 291–297, <https://doi.org/10.1111/j.1447-0756.1998.tb00092.x>.
- [65] J. Balthazart, M. Baillien, G.F. Ball, Interactions between aromatase (estrogen synthase) and dopamine in the control of male sexual behavior in quail, *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol* 132 (2002) 37–55, [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(01\)00531-0](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(01)00531-0).
- [66] A.G. Reznikov, N.D. Nosenko, L.V. Tarasenko, P.V. Sinityn, L.I. Polyakova, Early and long-term neuroendocrine effects of prenatal stress in male and female rats, *Neurosci. Behav. Physiol* 31 (2001) 1–5, <https://doi.org/10.1023/A:1026623427246>.
- [67] R.B. Simerly, L.W. Swanson, R.A. Gorski, The distribution of monoaminergic cells and fibers in a periventricular preoptic nucleus involved in the control of gonadotropin release: immunohistochemical evidence for a dopaminergic sexual dimorphism, *Brain Res* 330 (1985) 55–64, [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)90007-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)90007-1).
- [68] R.B. Simerly, M.C. Zee, J.W. Pendleton, D.B. Lubahn, K.S. Korach, Estrogen receptor-dependent sexual differentiation of dopaminergic neurons in the preoptic region of the mouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 14077–14082, <https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.14077>.
- [69] Y. Liu, Y. Jiang, Y. Si, J.-Y. Kim, Z.-F. Chen, Y. Rao, Molecular regulation of sexual preference revealed by genetic studies of 5-HT in the brains of male mice, *Nature* 472 (2011) 95–99, <https://doi.org/10.1038/nature09822>.
- [70] M. Angoa-Pérez, N. Herrera-Mundo, M.J. Kane, C.E. Sykes, J.H. Anken, D.M. Francescutti, D.M. Kuhn, Brain serotonin signaling does not determine sexual preference in male mice, *PLoS ONE* 10 (2015) 1–16, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118603>.
- [71] Y.Q. Ding, U. Marklund, W. Yuan, J. Yin, L. Wegman, J. Ericson, E. Deneris, R.L. Johnson, Z.F. Chen, Lmx1b is essential for the development of serotonergic neurons, *Nat Neurosci* 6 (2003) 933–938, <https://doi.org/10.1038/nn1104>.
- [72] T.J. Hendricks, D.V. Fyodorov, L.J. Wegman, N.B. Lelutiu, E.A. Pehek, B. Yamamoto, J. Silver, E.J. Weeber, J.D. Sweatt, E.S. Deneris, Pet-1 ETS gene plays a critical role in 5-HT neuron development and is required for normal anxiety-like and aggressive behavior, *Neuron* 37 (2003) 233–247, [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)01167-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)01167-4).
- [73] Z. Zhao, M. Scott, S. Chiechio, J. Wang, K.J. Renner, R.L. Johnson, E.S. Deneris, Z. Chen, Is Required for Maintenance of Central Serotonergic Neurons and Mice Lacking Central Serotonergic System Exhibit Normal Locomotor Activity, *J. Neurosci* 26 (2006) 12781–12788, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4143-06.2006>.
- [74] R. Blanchard, Review and theory of handedness, birth order, and homosexuality in men, *Laterality* 13 (2008) 51–70, <https://doi.org/10.1080/13576500701710432>.