

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, SEDE SUR

Departamento de Farmacobiología

**Conducta sexual femenina: saciedad sexual, efecto *Coolidge* y  
expresión genética de los receptores a opioides en el SNC**

Tesis que presenta:

**M. en C. Elisa Ventura Aquino**

Para obtener el grado de

**Doctora en Ciencias en**

**Neurofarmacología y Terapéutica Experimental**

Directores de la Tesis:

Dr. José Alonso Fernández Guasti y Dr. Raúl Gerardo Paredes Guerrero

Ciudad de México, abril de 2017



## Agradecimientos:

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio No 16 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Sede Sur; y en el Laboratorio D-11 del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, campus Juriquilla, bajo la dirección del Dr. José Alonso Fernández Guasti y del Dr. Raúl Gerardo Paredes Guerrero.

Este proyecto de investigación pudo lograrse gracias al apoyo otorgado mediante la beca No. 243413, del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).



### **Agradecimientos:**

**Al CONACyT y al CINVESTAV por darle oportunidad a aquellos que tenemos aspiraciones. Ha sido un honor formar parte de sus filas.**

**Al Dr Alonso Fernández Guasti y al Dr Raúl Paredes Guerrero, por darme la oportunidad de formarme en el maravilloso mundo de la ciencia, por su paciencia y su confianza.**

**A los miembros del Sínodo por sus valiosas aportaciones que sin duda, están reflejadas en este trabajo.**

**A la M. en C. Rebeca Reyes Serrano, a Blanca N. Gómez Quintanar y al Ing. José R. Fernández Calderón, personal del CINVESTAV, Sede Sur, por todo su valioso apoyo técnico y administrativo en momentos de crisis, así por su amistad.**

**A mis amigos, por las sonrisas y los buenos ratos.**

**A todas mis queridas ratas.**

**A mi mamá:**

**Eres lo más maravilloso de este mundo.**

## Lista de abreviaturas

<b>ADN</b> , ácido desoxirribonucleico	<b>E<sub>2</sub></b> , estradiol
<b>ADNc</b> , ácido desoxirribonucleico complementario	<b>EEM</b> , error estándar de la media
<b>AMG</b> , amígdala	<b>Est</b> , estriado
<b>AMG bl</b> , amígdala basolateral	<b>ER<math>\alpha</math></b> , receptor tipo alfa
<b>AMG Me</b> , amígdala media	<b>FSH</b> , hormona folículoestimulante
<b>AMPc</b> , adenosil monofosfato cíclico	<b>HVM</b> , hipotálamo ventromedial
<b>AP1</b> , proteínas activadoras 1	<b>ICV</b> , intracerebroventricular
<b>APO</b> , área preóptica	<b>IK</b> , Íkaros
<b>APOm</b> , área preóptica media	<b>KW</b> , Kruskal-Wallis
<b>ARN</b> , ácido ribonucleico	<b>LH</b> , Hormona luteinizante
<b>ATV</b> , área tegmental ventral	<b>LI</b> , latencia de intromisión
<b>BLAST</b> , <i>Basic Local Alignment Tool</i> , (búsqueda local básica de alineación)	<b>LM</b> , latencia de monta
<b>BOA</b> , bulbo olfatorio accesorio	<b>LRPI</b> , latencia de retorno post-intromisión
<b>CCI</b> , capa celular interna	<b>LRPM</b> , latencia de retornos post-monta
<b>CL</b> , cociente de lordosis	<b>M CON</b> , macho conocido
<b>CnoR</b> , cópula no regulada	<b>M NOV</b> , macho novedoso
<b>CP</b> , <i>crosspoint</i>	<b>MR</b> , medidas repetidas
<b>PLC</b> , preferencia de lugar condicionada	<b>MSI</b> , motivación sexual incentiva
<b>CR</b> , cópula regulada	<b>NA</b> , núcleo <i>accumbens</i>
<b>CycA</b> , cliclofilina A	<b>NaCl</b> , cloruro de sodio
	<b>NBET</b> , núcleo de la base de la estría terminal

**NCBI**, *National Center for Biotechnology Information*

**NFκβ**, factor nuclear κβ

**NIH**, Institutos Nacionales de Salud Norteamericanos

**NPM**, núcleo preóptico medio

**P<sub>4</sub>**, progesterona

**PCR**, reacción en cadena de la polimerasa

**PDIN**, prodinorfina

**PENC**, proencefalina

**POMC**, proopiomelanocortina

**PP**, preferencia de pareja

**PUSE**, penúltima serie eyaculatoria

**PV**, pálido ventral

**q-PCR**, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

**SE**, serie eyaculatoria

**SE1**, primera serie eyaculatoria

**SE2**, segunda serie eyaculatoria

**SGPA**, sustancia gris periacueductal

**SOD2**, superóxido dismutasa 2

**SP**, proteínas específicas

**SPI**, salidas post-intromisión

**SPM**, salida post-monta

**TATA**, timidina-adenina-timidina-adenina

**USE**, última serie eyaculatoria

**YWhaz**, proteína de activación de la tirosina 3-monooxigenasa

**#E**, número de eyaculaciones

**#I**, número de intromisiones

**#M**, número de montas

## Resumen

El presente trabajo trata de la relación de la conducta sexual con el sistema opioide endógeno en la rata hembra. El sistema opioide endógeno es uno de los mediadores principales en la conducta sexual, participa en las propiedades reforzantes de la cópula y en la saciedad sexual (inhibición de la conducta sexual por el despliegue de la misma), a través de sus principales receptores  $\mu$ ,  $\kappa$  y  $\delta$ . En hembras, la conducta sexual tiene dos componentes principales, proceptividad (conductas especie específicas que solicitan la atención del macho y que son consideradas como expresión de la motivación sexual) y receptividad (dorsiflexión que permite la intromisión del pene en la vagina) y se puede estudiar bajo dos condiciones experimentales, cópula regulada por la hembra (CR) y cópula no regulada (CnoR). Sólo las hembras que regulan la cópula presentan un estado afectivo positivo en el que participan los opioides endógenos. Se cree que tras la CR, éstos son liberados en áreas cerebrales que regulan la conducta sexual en la hembra como el área preóptica media (APOm), el hipotálamo ventromedial (VHM) y la amígdala (AMG). En el caso de la saciedad sexual, la administración de antagonistas del receptor opioide  $\mu$  induce la conducta sexual en machos sexualmente saciados. En hembras, la saciedad sexual, así como la influencia sobre la motivación y la conducta sexual, dada por una pareja sexual novedosa (efecto *Coolidge*) han sido poco estudiadas.

Evaluamos si la saciedad sexual y el efecto *Coolidge* se presentan en la rata hembra y si bajo dos condiciones de cópula (CR y CnoR) inducen cambios en la expresión de los genes que codifican para los receptores opioides  $\mu$ ,  $\kappa$  o  $\delta$  en el APOm, el HVM y la AMG. Para lo anterior, analizamos la conducta sexual femenina (proceptividad y receptividad) durante una sesión de 4 h de CR y CnoR con un macho sexualmente experimentado. Para estudiar el efecto *Coolidge* en hembras, evaluamos de forma inicial, la motivación sexual incentivada (MSI) por un macho sexualmente conocido (M CON) o uno novedoso (M NOV) tras 1 hora de cópula (CR o CnoR). Posteriormente, evaluamos la MSI por un incentivo sexual vs un incentivo social (hembra) así como la preferencia de pareja (PP).

Para estudiar si la conducta sexual modifica la expresión de los genes para los receptores  $\mu$ ,  $\kappa$  o  $\delta$ , se formaron diversos grupos independientes: a) Una sesión de 1 h de CR y CnoR, obtención de áreas cerebrales a las 4, 12 y 24 horas, b) Cuatro sesiones de 1 h (cada 5 días), obtención de tejidos cerebrales a las 24 h de la última sesión. c) Una sesión de 4 h de CR y CnoR, obtención de tejidos cerebrales a las 24 h de la última sesión.

Como resultados obtuvimos que las hembras muestran una mayor motivación sexual por un compañero sexual novedoso, que por uno con el que ya han copulado (M CON), independientemente de la condición de cópula, denotando el efecto *Coolidge* en hembras. No obstante, durante la prueba de preferencia de pareja, a pesar de mostrar más tiempo de estancia en el compartimento con el M NOV; las hembras copularon por igual con ambos machos.

Durante la prueba de cópula durante 4 h, se encontró un declive en la proceptividad en CR y CnoR, mas no su extinción, mientras que la receptividad no se modificó. Estos eventos conductuales no se relacionan con modificaciones en la expresión del gen que codifica para el receptor opioide  $\mu$  en el APOm. Asimismo, ninguno de los esquemas de cópula modificó la expresión genética de los receptores a opioides estudiados en las áreas analizadas por lo que proponemos que se activan mecanismos reguladores postranscripcionales y a nivel de receptores tras la cópula.

## Abstract

The endogenous opioid system is an important mediator of sexual behavior, involved in sexual reward and sexual satiety (defined as the sexual inhibition by the execution of sexual behavior), throughout its three main receptors,  $\mu$ ,  $\kappa$  and  $\delta$ . In females, sexual behavior is composed by two aspects, proceptivity (species-specific behaviors that incite the male to mate, considered to reflect sexual motivation; and receptivity or lordosis (dorsiflexion that enables the penis intromission in the vagina). Female sexual behavior may be evaluated in two mating conditions: paced and non-paced. Only when paced by the female, sexual behavior induces a reward state probably due to the release of endogenous opioids in brain areas that regulate this behavior such as the medial preoptic area (mPOA), the ventromedial hypothalamus (VMH) and the amygdala (AMG). Opioids also are involved in sexual satiety, at least in males, because the administration of  $\mu$ -antagonists induces the resumption of sexual behavior in sexually satiated subjects. However, sexual satiety and the *Coolidge* effect (defined as sexual resumption by a novel partner in a sexually satiated animal) have been poorly studied in females.

In the present study, we evaluate if sexual satiety and the Coolidge effect are present in female rats and if different schemes of sexual behavior induce changes in genes' expression for  $\mu$ ,  $\kappa$  or  $\delta$  receptors in the MPOA, the HVM and the AMG. We first analyzed the proceptivity and receptivity during a 4h mating session with a sexual experienced male. Second, we evaluated the sexual incentive motivation (SIM) of a female for a novel sexual partner, compared with a known male (a male that copulated with the female before the test) after 1 h of paced or non-paced mating. In a last test, we evaluated the SIM for a sexual vs a social incentive and the partner preference (PP) for a novel or a known sexual partner.

We also studied putative changes in the gene expression of opioid  $\mu$ ,  $\kappa$  and  $\delta$  receptors, in the following experimental groups: a) One-hour of paced or non-paced mating, and the brain areas analyzed 4, 12 and 24 h after the mating test; b) four mating session (every fifth day), and the brain areas studied 24 h after the last mating test; and c) 4 h of continuous paced or non-paced mating, and the brain areas analyzed 24 h after mating.

Females showed more sexual motivation for the new male than the known one in both mating conditions, denoting the presence of the *Coolidge* effect in females. However, in the PP test, females spent more time with the new male but copulated similarly with both males.

During the 4 h of mating, proceptivity declined under both mating conditions but it was not completely abolished. In this test receptivity was not altered. Gene expression for opioid receptors was not modified by mating in no experimental group. It is possible that posttranscriptional mechanisms and at the level of the receptors might regulate the opioids system during mating behavior.

# Contenido

	Página
1.1 Conducta sexual femenina de la rata.....	1
1.1.1 Ciclo estral de la rata .....	1
1.1.2 Receptividad.....	2
1.1.3 Proceptividad.....	3
1.2 Cópula regulada por la hembra (CR).....	3
1.3 Motivación sexual incentiva.....	5
1.5 Saciedad sexual y efecto <i>Coolidge</i> .....	8
1.6 Recompensa sexual .....	10
1.7 Red de toma de decisiones sociales.....	11
1.8 Sistema opioide endógeno.....	13
1.9 Opioides y conducta sexual .....	15
II. Justificación del problema .....	24
III. Hipótesis general .....	25
3. 1 Hipótesis particulares .....	25
Saciedad sexual.....	25
Efecto <i>Coolidge</i> .....	25
Expresión genética .....	26
IV. Objetivos.....	26
V. Materiales y métodos .....	26
5.1 Prueba de motivación sexual incentiva.....	27
5.2 Prueba de preferencia de pareja .....	27
5.3 Experimento 1: evaluación de la saciedad sexual en hembras .....	28
5.4 Experimento 2: evaluación del Efecto <i>Coolidge</i> en hembras.....	30
5.5 Experimento 3: Conducta sexual y expresión genética de receptores a opioides .....	31
5. 6 Obtención de las áreas cerebrales de interés.....	32
5.7 Extracción y purificación de ácido ribonucleico (ARN) .....	34
5.8 Síntesis de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) .....	35
5.9 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.....	35
5.10 Cuantificación relativa.....	39

VI. Resultados .....	43
6.1 Saciedad sexual.....	43
6.2 Efecto <i>Coolidge</i> en hembras.....	46
6.3 Cópula y expresión génica de receptores a opioides .....	50
VII. Discusión.....	58
7.1 Saciedad sexual.....	58
7.2 Efecto <i>Coolidge</i> en hembras.....	60
7.3 Cópula y expresión genética de receptores a opioides.....	63
7.3.1 Regulación transcripcional de los genes que codifican para los receptores a opioides .....	64
VIII. Conclusiones.....	70
IX. Perspectivas.....	71
X. Referencias.....	72

## I. Introducción

### 1.1 Conducta sexual femenina de la rata

La rata hembra, al igual que las hembras de la mayoría de los mamíferos, despliega la conducta sexual sólo cuando existen las condiciones hormonales adecuadas, ya sea durante el ciclo estral o por la inducción de la receptividad sexual por la administración de hormonas exógenas.

#### 1.1.1 Ciclo estral de la rata

El ciclo estral tiene una duración de 5 días en promedio y se divide en cuatro etapas: metaestro, diestro, proestro y estro (Blaustein & Mani, 2007). Estas fases están controladas por una cascada de eventos neuroendocrinos, incluyendo la activación del eje hipotálamo- hipófisis- ovario. En la fase de metaestro, se estimula la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH por sus siglas en inglés) y de la hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés). La FSH estimula la proliferación de los folículos en el ovario y la síntesis de estrógenos que, al incrementar su concentración, retroalimenta positivamente la secreción de LH. Este pico en la concentración de LH se acompaña de un pico de secreción de progesterona ( $P_4$ ) que preceden a la ovulación en la fase de proestro –fase en la que se despliega la conducta sexual–. Si no ocurre la fecundación del óvulo, los niveles hormonales regresarán a los niveles basales, repitiéndose el ciclo (figura 1). Cada una de las fases del ciclo estral puede diferenciarse por las características del epitelio vaginal (Goldman *et al.*, 2007).

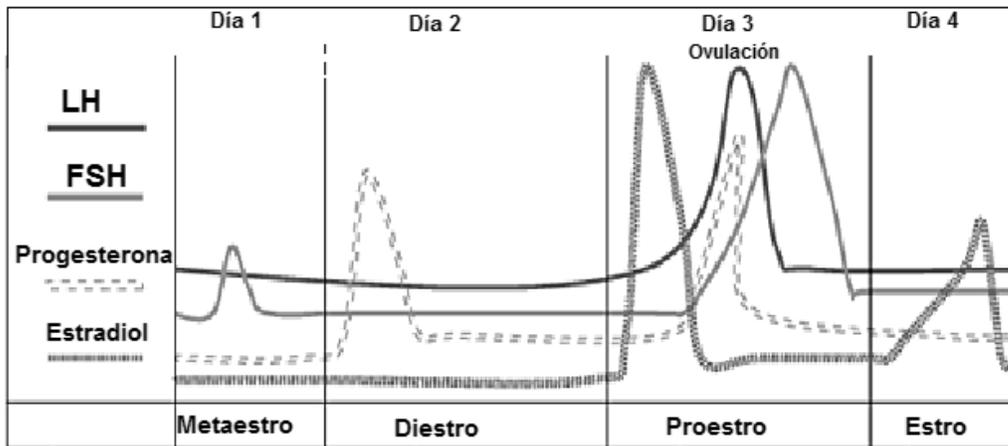


Figura 1. Ciclo estral en la rata (modificado de Goldman *et al.*, 2007). Se muestra los niveles hormonales a lo largo del ciclo.

La variación en los niveles hormonales, durante la fase de proestro, coincide con la conducta sexual la cual, para el caso de la rata hembra tiene dos componentes principales: la receptividad y la proceptividad.

### 1.1.2 Receptividad

Las hembras de ciertas especies despliegan la posición de lordosis en respuesta a la estimulación perineal y de los flancos que permite la entrada del pene en la vagina (Blaustein & Erskine, 2002; Ágmo, 2007a). La postura de lordosis consiste en la inmovilidad de la hembra, extensión de las patas delanteras, dorsiflexión de la columna vertebral, elevación de la cabeza y desviación de la cola hacia un lado; lo que expone la entrada vaginal. La respuesta de lordosis se presenta gracias a las aferencias del nervio pudendo interno, que inerva un área de aproximadamente 2 cm alrededor del clítoris. La sensibilidad de esta área es mayor durante la fase de receptividad sexual que en el resto del ciclo, favoreciendo la estimulación sexual y la respuesta de lordosis (Adler *et al.*, 1977). Una manera de cuantificar la receptividad sexual es por medio del cociente de lordosis (CL), el cual se calcula con la siguiente fórmula y se expresa en porcentaje (Blaustein & Mani, 2007):

$$CL = \frac{\text{Número de lordosis desplegadas}}{\text{Número de montas recibidas}} \times 100$$

### **1.1.3 Proceptividad**

Las hembras de diversas especies determinan el inicio de la cópula durante el periodo de receptividad sexual a través de una gama de conductas especie-específicas que denotan la disponibilidad de la hembra para copular y que se expresan ante la presencia del macho. Estas conductas se denominan conductas proceptivas (McClintock *et al.*, 1982). Las más representativas en la rata son las siguientes (Edwards & Pfeifle, 1983):

Orejeo: movimientos cortos y rápidos de la cabeza que producen a su vez un aleteo fino de las orejas.

Brincoteo: pequeños saltos con las cuatro extremidades extendidas.

Zig-zagueo: carreras que la hembra realiza con cambios abruptos de dirección para finalmente detenerse y permitir la monta del macho.

Las conductas proceptivas reflejan la iniciativa de la hembra por interactuar sexualmente con el macho y para mantener esta interacción, por lo que han sido consideradas como indicador de la motivación sexual (Rössler *et al.*, 2006; Ventura-Aquino & Fernández-Guasti, 2013). Se ha reportado que hasta el 90% de las intromisiones logradas por el macho, son precedidas por conductas de solicitud de la hembra en condiciones naturales y seminaturales (McClintock & Anisko, 1982). En estos ambientes, la hembra tiene un papel muy activo en establecer el ritmo de la cópula. Una manera de estudiar en condiciones de laboratorio el papel activo que tiene la hembra en la interacción sexual es mediante la cópula regulada (CR).

### **1.2 Cópula regulada por la hembra (CR)**

La CR es la condición experimental en la cual la hembra tiene el control del inicio y de la continuación de los acercamientos sexuales, lo que simula mejor lo que sucede en el medio natural y seminatural (McClintock *et al.*, 1982). Una manera de realizar la CR es con una caja de acrílico, dividida en dos compartimentos conectados por un orificio cerca de la base, por el cual

sólo la hembra pueda pasar debido a su tamaño menor con respecto al del macho (figura 2).

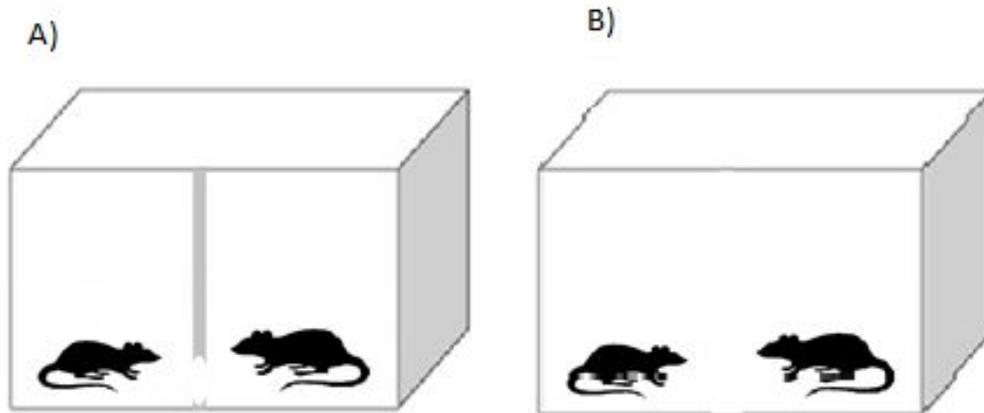


Figura 2. Cajas de observación empleadas para el estudio de la conducta sexual A) cópula regulada por la hembra, B) cópula no regulada por la hembra.

La CR tiene consecuencias diferentes de las que tiene la cópula no regulada (CnoR). Desde el punto de vista fisiológico, las hembras que regulan la cópula reciben estimulación vaginocervical cuantitativa (menor número de intromisiones) y cualitativamente (el periodo entre una intromisión y otra, y la duración de estas intromisiones son mayores, en comparación de la condición CnoR) diferente a la recibida cuando el macho es el que la regula (Erskine *et al.*, 1989; Martínez & Paredes, 2001). Asimismo, en la CR se requiere de menos intromisiones para inducir el estado de pseudopreñez, que consiste en la permanencia del cuerpo lúteo, lo que puede favorecer la implantación del óvulo fecundado y con ello, la reproducción (Erskine *et al.*, 1989; Kornberg & Erskine, 1994). Otra diferencia importante es que sólo la CR ha demostrado tener un carácter reforzante, induciendo un estado de afecto positivo (considerado análogo al placer en humanos), evaluado por el paradigma de cambio de preferencia de lugar condicionada (CPL) (Paredes & Vazquez, 1999; García-Horsman *et al.*, 2008).

La CR tiene dos componentes principales que pueden ser medidos: el componente sensorial y el motivacional (Erskine, 1992). El componente sensorial se refiere a la capacidad de la hembra de discernir el tipo de

estimulación sexual que recibe. Éste se calcula mediante el porcentaje de salidas de la hembra del compartimento donde se encuentra el macho, después de haber recibido una monta, una intromisión o una eyaculación. El componente motivacional se calcula midiendo el tiempo que tarda la hembra en regresar (latencia de retorno) al compartimento donde se encuentra el macho, después de que ha salido por haber recibido una monta, una intromisión o una eyaculación, y se considera que denota la disposición de la hembra para continuar copulando. Ambos componentes se correlacionan positivamente con la intensidad del estímulo que la hembra recibe, por lo que es mayor el porcentaje de salidas después de que la hembra recibió una eyaculación o una intromisión, que después de que recibió una monta; y las latencias de retorno son mayores después de una eyaculación o una intromisión, que aquéllas presentadas después de una monta (Zipse *et al.*, 2000).

La CR se ha propuesto como una condición que evalúa no sólo los componentes consumatorios de la cópula, sino que gracias a sus características, también evalúa los aspectos motivacionales para iniciar y mantener esta interacción. Sin embargo, existen otras maneras de evaluar la motivación sexual, midiendo las conductas de acercamiento que realiza un sujeto en torno a un incentivo de índole sexual, al cual no se tiene libre acceso, por ejemplo, mediante la prueba de motivación sexual incentiva (MSI)(Ágmo, 1999; Ágmo *et al.*, 2004).

## **1.2 Motivación sexual incentiva**

En la mayoría de las hembras de mamíferos, las condiciones hormonales son las que determinan que un conespecífico se torne en un incentivo sexual (Ágmo, 1999; Ágmo *et al.*, 2004; Ellingsen & Ágmo, 2004). Durante el periodo de receptividad sexual para la hembra, incrementa el valor incentivo de un macho, lo que desencadena la búsqueda activa de un compañero sexual. Las conductas de acercamiento y su persistencia serán el reflejo de la motivación sexual por el incentivo; es decir, habrá más acercamiento por aquel sujeto con mayor valor incentivo. La prueba de

motivación incentiva (MSI) evalúa estas conductas de acercamiento. La prueba de MSI se realiza en una arena rectangular que tiene dos compartimentos colocados en lados opuestos (Ágmo, 1999) (figura 3). En cada compartimento se coloca a cada sujeto incentivo (macho intacto, macho castrado, hembra sexualmente receptiva, etc.). Posteriormente se evalúa el tiempo de estancia del sujeto experimental en la vecindad de uno u otro incentivo. Se ha medido la MSI en ratas hembras ovariectomizadas, con inducción de la receptividad sexual por la administración de hormonas gonadales y se ha demostrado que permanecen más tiempo en la zona incentiva de un macho intacto, que de uno castrado; mientras que las hembras que no están sexualmente receptivas, no muestran preferencia por ninguno de estos incentivos (Ágmo, 1999). También se ha evidenciado que la MSI disminuye después de la cópula. Es decir, las hembras que reciben tres eyaculaciones previas a la prueba de MSI, permanecen el mismo tiempo en la zona incentiva de un macho intacto que en la de uno castrado, a diferencia de aquellas que no han copulado previamente. Estos resultados denotan la dependencia hormonal de la rata hembra para que incremente el interés por una pareja sexual, y que la ejecución de la cópula disminuye el interés o la motivación sexual subsecuente (Ágmo *et al.*, 2004). Una de las grandes ventajas de la prueba de MSI es que se puede estudiar específicamente el componente apetitivo de la cópula ya que no permite el contacto físico entre el sujeto experimental con los sujetos incentivos; mientras que las conductas consumatorias pueden evaluarse por medio de otros paradigmas como el de preferencia de pareja (PP).

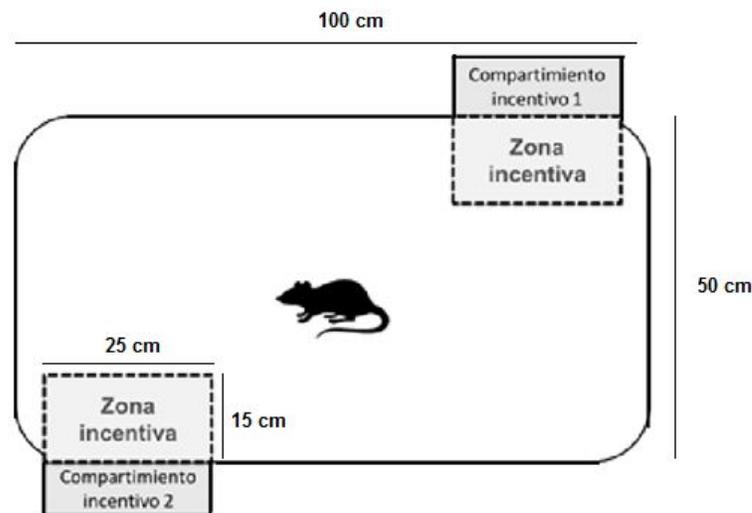


Figura 3. Arena donde se realiza la prueba de motivación sexual incentivada (adaptado de Ágmo, 2004).

#### 1.4 Preferencia de pareja

En esta prueba, el sujeto experimental puede moverse libremente a través de una arena con tres compartimentos, en la cual se colocan los sujetos incentivos en los compartimentos laterales, sujetos con un arnés como se muestra en la figura 4 (Broekman *et al.*, 1988; Paredes *et al.*, 1998). De esta forma, se puede evaluar la búsqueda activa de un compañero sexual, la preferencia por un incentivo u otro, y la ejecución de la cópula. Se ha reportado que las hembras en proestro, así como aquellas ovariectomizadas y tratadas con estradiol ( $E_2$ ) y  $P_4$ , permanecen más tiempo con un macho sexualmente activo, que con uno castrado (Broekman *et al.*, 1988).

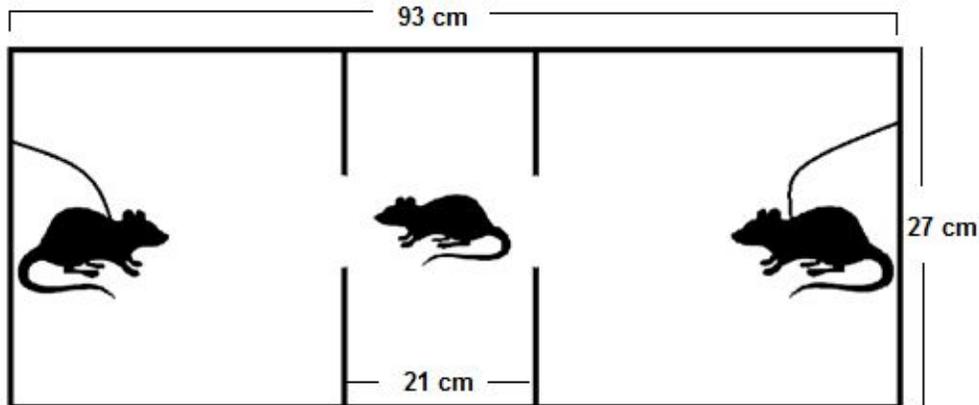


Figura 4. Arena de tres compartimentos donde se realiza la prueba de preferencia de pareja.

Existen eventos relacionados con la conducta copulatoria que influyen sobre la motivación sexual, como en la elección de pareja, tales como la saciedad sexual y el efecto *Coolidge*.

### 1.5 Saciedad sexual y efecto *Coolidge*

La saciedad sexual se puede definir, en machos, como la inhibición de la cópula, consecuencia de la ejecución repetida y exagerada de la misma. Es decir, un macho que ha copulado ininterrumpidamente con una misma hembra, llegará a la inhibición de la conducta sexual. Se ha utilizado varios criterios para establecer que un macho se encuentra sexualmente, entre los cuales está un periodo de 90 minutos sin presentar una eyaculación (Phillips-Farfán & Fernández-Guasti, 2009) o 30 minutos sin presentar una monta (Beach & Jordan, 1956). Si inmediatamente después de que se establece la saciedad sexual, se presenta una hembra desconocida, el macho puede reiniciar la cópula. A este reinicio de la conducta sexual, desencadenada por una pareja sexual novedosa, se le conoce como el efecto *Coolidge* (Bermant *et al.*, 1968). Se ha propuesto que la inhibición de la cópula durante la saciedad sexual es consecuencia de la habituación al mismo estímulo sexual, y el reinicio de la cópula ante la nueva pareja sexual, consecuencia de una deshabituación marcada (Ágmo, 2007a). Existen numerosas interpretaciones acerca de las consecuencias del efecto *Coolidge*, que van desde la fertilización de más hembras, a la remoción del tapón seminal

dejado por otros machos (Tlachi-López *et al.*, 2012; Lucio *et al.*, 2014). Por otro lado, la saciedad sexual y el efecto *Coolidge* se han evaluado escasamente en las hembras.

En los años ochenta se mostró que las hembras de los hámsteres dejan de asumir la posición de lordosis tras la cópula continua con un mismo macho, y que reanudan esta posición si se presenta un macho sexualmente novedoso (Lester & Gorzalka, 1988). En otro estudio hecho en ratas hembra a las que se les permitió regular la cópula con un macho hasta el criterio de saciedad sexual (20 minutos sin pasar al compartimento del macho) tras los cuales se les presentaba ya sea un macho novedoso o aquél con el que habían copulado previamente. Aquellas hembras que fueron expuestas a un macho desconocido presentaron más conductas proceptivas y tardaban menos tiempo en regresar al compartimento del macho para continuar la cópula, en comparación con las hembras a las que se les presentó el macho inicial (Ágmo, 2007a).

Considerando a las conductas proceptivas como un componente motivacional de la conducta sexual femenina, estudiamos en ratas hembras en fase de proestro, si a lo largo de 90 minutos de cópula continua se acompañaban de la disminución en la proceptividad (brincoteo/zig-zagueo y orejeo) en dos condiciones de cópula, CR y CnoR. Posteriormente, evaluamos si la presentación inmediata de un macho novedoso producía modificaciones en las conductas proceptivas, con el que se permitió la cópula por otros 90 minutos restantes (Ventura-Aquino & Fernández-Guasti, 2013). Encontramos que, tras los primeros 90 minutos de cópula (regulada o no), las hembras presentan un declive en los niveles de proceptividad, pero sólo aquellas que regularon la cópula muestran un incremento en la cantidad de estas conductas cuando se les reemplaza el macho inicial (ya conocido) por uno novedoso. A la disminución de la proceptividad en los primeros 90 minutos de cópula, así como al repunte observado ante la el macho sexualmente novedoso se consideró como la expresión del efecto *Coolidge*

en hembras, lo que a su vez, abrió la posibilidad de evaluar el efecto de la novedad sexual sobre la conducta sexual femenina en otros paradigmas, que podrían sumarse a la evidencia sobre la expresión de efecto *Coolidge* en hembras. Por otro lado, en ambas condiciones de cópula (regulada o no), hacia el final de la prueba, es decir, tras 180 minutos de cópula continua, las hembras mostraron una disminución importante en los niveles de proceptividad y, en el caso de la CR, las hembras pasaron más tiempo en el compartimento neutro y cruzaron menos veces al compartimento con el macho, denotando una baja en la motivación para interactuar con éste. Sin embargo, la proceptividad no se abolió por completo, por lo que no pudo establecerse la equivalencia en la expresión conductual análoga clásica de la saciedad sexual en machos, que consiste en la extinción de la conducta copulatoria. Uno de los motivos por los que no se observó la inhibición completa de la conducta sexual pudo deberse justamente al aumento en la proceptividad que indujo la introducción de un macho novedoso, por lo que sería de utilidad evaluar la proceptividad con otros paradigmas. Por ejemplo, extender el tiempo de cópula con un mismo macho, evitando con ello la novedad sexual.

La importancia de estudiar a las conductas que son intrínsecamente reforzantes como la conducta sexual, la conducta maternal o la de juego, radica en conocer sobre la neurobiología de los mecanismos de la recompensa, y con ello, encontrar los sustratos que inician, dirigen y mantienen a estas conductas (Paredes, 2014).

### **1.6 Recompensa sexual**

Los mecanismos involucrados en el procesamiento de la recompensa han sido ampliamente estudiados en el campo de las drogas de abuso, ya que éstas actúan sobre los sistemas de recompensa que regulan las conductas intrínsecamente reforzantes (Kelley & Berridge, 2002). Hay varias consideraciones que indican que la recompensa proporcionada por las drogas de abuso, y aquella de las conductas naturalmente reforzantes difieren entre sí en aspectos importantes. Por ejemplo, el efecto de las

drogas de abuso generalmente se acompaña por la aparición de tolerancia farmacológica, es decir de una disminución del efecto reforzante ante una misma dosis dada, así como de cambios plásticos adaptativos a largo plazo que podrían contribuir a otros cambios conductuales tales como el déficit en la toma de decisiones, así como a la impulsividad que suelen acompañar al consumo de estas sustancias (Kelley & Berridge, 2002). Estas modificaciones no se observan después de las conductas que son intrínsecamente reforzantes. Las bases neuronales que modulan el despliegue de estas conductas se han agrupado en dos sistemas principales, el sistema mesolímbico dopaminérgico y la red de conductas sociales que juntas forman, a su vez, un circuito más grande denominado la red de toma de decisiones sociales. Esta red regula aquellas conductas en las que un animal recibe señales del ambiente, las cuales integra con su propio estado fisiológico para finalmente tomar una decisión y ejecutar una respuesta (O'Connell & Hofmann, 2011b; O'Connell & Hofmann, 2011; 2012). Esta red se encuentra altamente conservada entre las especies ya que se han descrito estructuras homólogas en peces, anfibios, reptiles y mamíferos, lo que sugiere su gran importancia en la evolución social de los vertebrados (O'Connell & Hofmann, 2011b).

### **1.7 Red de toma de decisiones sociales**

La figura 5 ilustra las áreas cerebrales involucradas en la toma de decisiones sociales (O'Connell & Hofmann 2011), formada por el sistema mesolímbico dopaminérgico (figura 5, panel superior) y la red de conductas sociosexuales (figura5, panel inferior). Ambas redes se interconectan en las áreas que se muestran en verde.

El sistema mesolímbico dopaminérgico es el sustrato neural donde se evalúan los rasgos importantes o sobresalientes de un estímulo externo. Este circuito contiene proyecciones dopaminérgicas del área tegmental ventral (ATV) hacia el núcleo *accumbens* (NA). Otras áreas involucradas en este sistema son el *septum* lateral (SL), el ventral *pallidum*, el estriado, la amígdala basolateral (AMG bl), el núcleo de la base de la estría terminal

(NBET) y el hipocampo (O'Connell & Hofmann, 2011b; O'Connell & Hofmann, 2011).

La red de conducta sociales se compone de seis áreas cerebrales (la AMG media, el área preóptica, el hipotálamo anterior, el HVM, la sustancia gris periacueductal, el septum lateral y el núcleo de la base de la estría terminal) que participan en la regulación de las conductas de mamíferos tales como la sexual, la agresiva y la parental (figura 5, panel inferior). Estas regiones se encuentran anatómicamente conectadas y expresan receptores a hormonas sexuales (Newman, 1999; O'Connell & Hofmann, 2011).

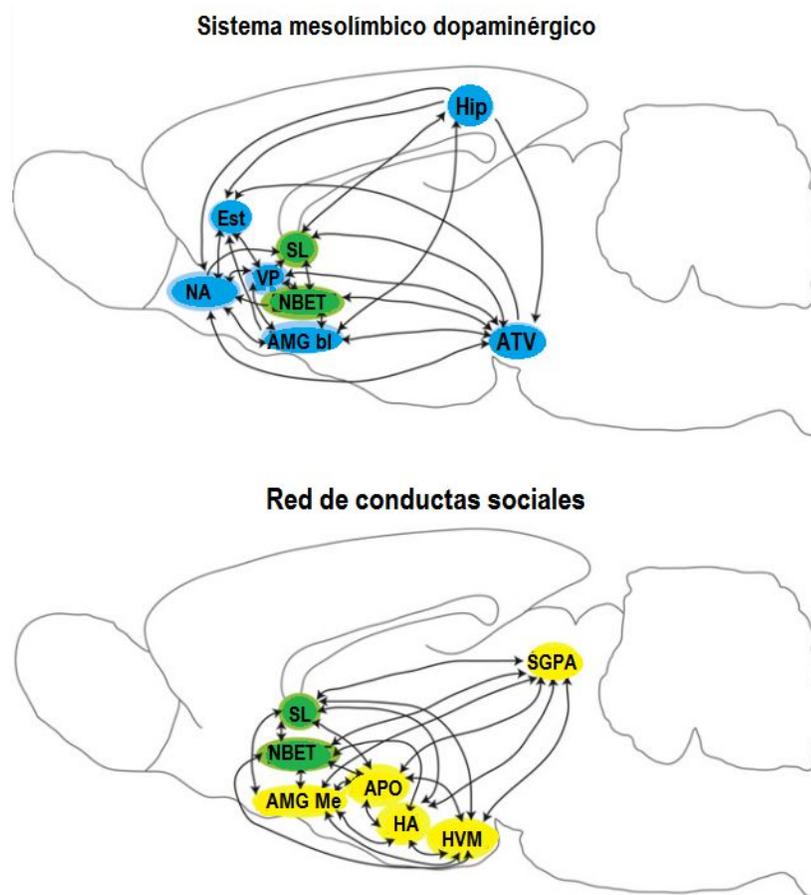


Figura 5. Áreas cerebrales que pertenecen a la red de conductas sociales en azul y al sistema mesolímbico de recompensa en amarillo, los cuales convergen en las áreas en verde. Ambas redes tienen estrechas uniones anatómicas entre ellas, señaladas por flechas. Imagen tomada y modificada de O'Connell y Hofmann (2011). AMG bl: amígdala basolateral, AMG Me: amígdala media, APO: área preóptica, ATV: área tegmental ventral, Est: estriado, HA: hipotálamo anterior, Hip: hipocampo, HVM: hipotálamo ventromedial, NBET: núcleo de la base de la estría terminal, NA: núcleo *accumbens*, SGPA: sustancia gris periacueductal, SL: septum lateral, VP: ventral *pallidus*.

### 1.8 Sistema opioide endógeno

Los opioides endógenos ejercen sus efectos por medio de tres receptores principales:  $\mu$ ,  $\kappa$  y  $\delta$ . Los receptores a opioides presentan una analogía estructural del 60%. En el sistema nervioso, se localizan tanto en la pre, como en la post-sinapsis (Hadjiconstantinou & Neff, 2011). Estos receptores comparten una estructura similar de siete dominios transmembranales, un dominio N-terminal localizado en el exterior de la célula y un dominio carboxilo terminal en el interior, y se encuentran acoplados a la proteína  $G_{i/o}$  (Koneru et. al, 2009). Su activación produce el cierre de los canales de calcio sensibles a voltaje, apertura de canales de potasio; así como a la inhibición de la enzima adenilato ciclasa y la disminución del adenosil monofostato cíclico (AMPC). Todos estos mecanismos reducen la neurotransmisión debido a que favorecen la hiperpolarización celular (Giuliano *et al.*, 2008; McDonald & Lambert, 2011).

Los receptores a opioides se expresan ampliamente en el cerebro, principalmente en la corteza, el sistema límbico, el tallo cerebral y en el sistema nervioso periférico (Bodnar, 2007; Le Merrer *et al.*, 2009). En la figura 6 se muestra la distribución anatómica en el sistema nervioso central de los genes para estos receptores, la cual, en términos generales, coincide con los sitios de la expresión de las proteínas los cuales frecuentemente se sobrepone, aunque algunas estructuras expresan con mayor densidad un receptor que otro (Le Merrer *et al.*, 2009). Por ejemplo, el receptor  $\mu$  se expresa mayormente en la AMG, el tálamo, el hipotálamo, el mesencéfalo y el tallo cerebral (Bodnar, 2007; Le Merrer *et al.*, 2009). El receptor  $\kappa$  se localiza primordialmente en la corteza cerebral, el tubérculo olfatorio, el área preóptica (APO), el hipotálamo y la hipófisis. El receptor  $\delta$  es abundante en el tracto olfatorio y la AMG (Bodnar, 2007; Le Merrer *et al.*, 2009). Los receptores  $\mu$  y  $\kappa$  coexisten en la mayoría de las estructuras mientras que la distribución del receptor  $\delta$  es más restringida, siendo baja su expresión en el

hipotálamo, el tálamo mesencefálico y el tallo cerebral (Bodnar, 2007; Le Merrer *et al.*, 2009).

A pesar de tener sistemas de transducción similares, la activación de los receptores a opioides puede producir efectos conductualmente opuestos. Por ejemplo, la administración sistémica de agonistas  $\mu$  y  $\delta$  producen preferencia de lugar; mientras que la de agonistas de los receptores  $\kappa$  produce aversión de lugar, disforia y anhedonia, por lo que se cree que estos últimos ejercen efectos opuestos a los receptores  $\mu$  y  $\delta$ , fungiendo como reguladores (Giuliano *et al.*, 2008). Los ligandos endógenos de los receptores a opioides se componen de más de una veintena de péptidos agrupados en tres familias principales: endorfinas, encefalinas y dinorfinas, los cuales se forman a partir de sus respectivos precursores: proopiomelanocortina (POMC), proencefalina (PENC) y prodinorfina (PDIN)(Giuliano *et al.*, 2008; Hadjiconstantinou & Neff, 2011; McDonald & Lambert, 2011). La POMC se sintetiza en los cuerpos neuronales localizados en el núcleo arcuato del hipotálamo y en el núcleo del tracto solitario. Los péptidos derivados de PENC Y PDIN tienen una distribución más amplia que incluye al núcleo *accumbens*, el hipocampo, la AMG, el tubérculo olfatorio y el hipotálamo. Los opioides endógenos comparten una secuencia en su extremo amino terminal formada por los aminoácidos Tyr-Gly-Gly-Phe, la cual interactúa con los diferentes receptores (Giuliano *et al.*, 2008; McDonald & Lambert, 2011). La afinidad de los ligandos endógenos de los receptores a opioides se debe a diversos factores, entre ellos a las variaciones que presentan en el resto de la secuencia de aminoácidos que los conforman, sobre todo en aquellas secciones de las secuencias que interaccionan con los dominios extracelulares de cada subtipo de receptor a opioides (Kane *et al.*, 2006).

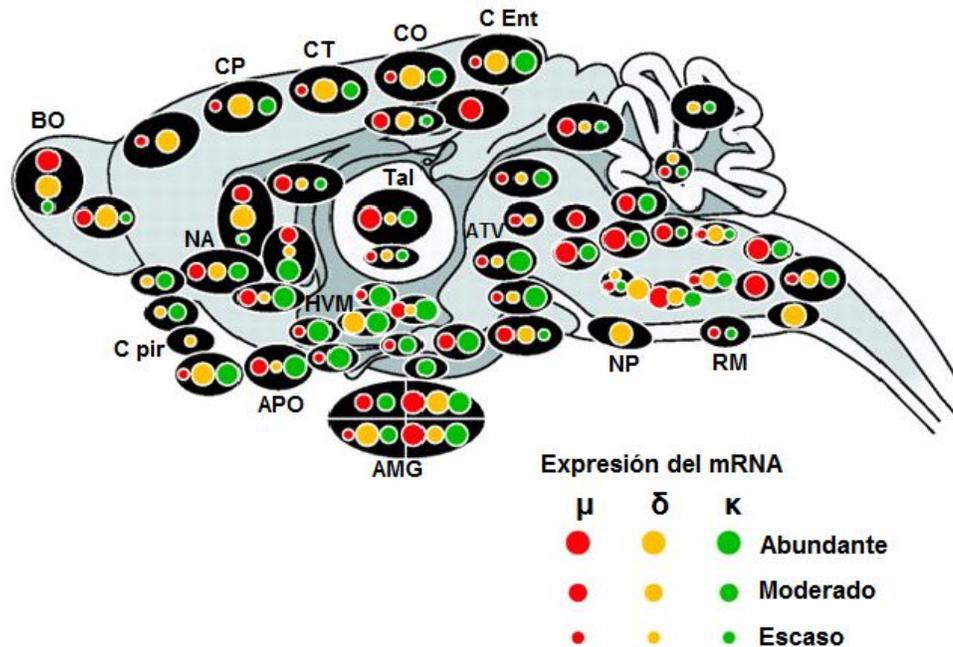


Figura 6. Distribución anatómica de los cuerpos neuronales que expresan el ARNm, detectados por la técnica de hibridación *in situ*, de los genes que codifican para los receptores a opioides en el cerebro de los roedores. AMG, amígdala; APO, área preóptica; ATV, área tegmental ventral; BO, bulbo olfatorio; C Ent, corteza entorrinal; CO, corteza occipital; CP, corteza parietal, C pir, corteza piriforme; CT, corteza temporal; HVM, hipotálamo ventromedial; NA, núcleo accumbens; AP, núcleo pontino; RM, rafé magno; Tal, tálamo. Imagen tomada y modificada de Le Merrer *et al*, (2009).

### 1.9 Opioides y conducta sexual

Como se describió en el apartado anterior, el sistema opioide endógeno está ampliamente distribuido en el sistema límbico y en el hipotálamo; se le ha relacionado con la regulación de algunas acciones de las hormonas esteroideas en esos sitios. Por ejemplo, en ratas hembras intactas, existen variaciones importantes en la actividad de los receptores opioide  $\mu$  a lo largo del ciclo estral (Sinchak & Micevych, 2003). Se presenta la activación e internalización de éstos en el núcleo preóptico medio (NPM) y la AMG media, que son mayores en las fases en la que no se presenta receptividad sexual (metaestro y diestro). Conforme los niveles de estrógenos aumentan, al final del diestro, la activación e internalización de estos receptores disminuye, siendo menores durante la tarde y noche del proestro, coincidiendo con el periodo de máxima receptividad sexual. La terminación de esta fase se acompaña de un aumento de la actividad e

internalización de los receptores a opioides  $\mu$  (Sinchak & Micevych, 2003). También se ha relacionado a la activación de estos receptores, con la inhibición de la secreción de LH, en las neuronas que contienen a la hormona liberadora de gonadotropina en el APOm (Micevych & Sinchak, 2007), mientras que el papel de los receptores  $\delta$  y  $\kappa$  sobre la secreción de LH es menor.

La interrelación entre el sistema opioide endógeno y las hormonas sexuales se ha descrito también en ratas hembra ovariectomizadas, en las que la administración de 50 $\mu$ g/s.c de benzoato de E<sub>2</sub> (BE) produce la internalización del receptor  $\mu$  en el APOm, el NPM y en la AMG media. Esta internalización se mantiene durante las 24 h siguientes a la administración de BE, periodo que se requiere para que la administración de P<sub>4</sub> facilite la receptividad sexual. La expresión de los receptores  $\mu$  en la membrana neuronal regresa a niveles basales a las 48 h posteriores a la administración de BE (Eckersell *et al.*, 1998; Sinchak & Micevych, 2003). Por otro lado, si se antagoniza al receptor a opioides de tipo  $\mu$ , esta internalización se previene y es menor el efecto facilitador de la P<sub>4</sub> sobre la receptividad sexual (Eckersell *et al.*, 1998; Sinchak & Micevych, 2003).

Se han realizado diferentes estudios de índole farmacológica para evaluar la participación de los receptores a opioides en la conducta sexual femenina. Uno de ellos fue el realizado por Pfaus y colaboradores (1992) quienes administraron, en el ventrículo lateral derecho, agonistas selectivos para cada subtipo de receptor a opioides, a hembras ovariectomizadas y tratadas con dosis subóptimas de BE solo, o con BE + P<sub>4</sub>. Los resultados de éste y de otros trabajos que han evaluado cómo los opioides participan en la conducta sexual femenina se resumen en la tabla 1. Como se observa, la mayoría de estos estudios se han hecho en la condición de CnoR y se han enfocado al efecto sobre la receptividad sexual. En términos generales, la estimulación farmacológica de los receptores de tipo  $\mu$  inhibe la receptividad sexual; mientras que su bloqueo tiene un efecto que depende del sitio de

administración, ya que en el APOm facilita la lordosis, y en el HVM no la modifica. Por otro lado, la activación de los receptores  $\delta$  con un agonista administrado por vía intracerebroventricular (ICV), facilita la lordosis y la proceptividad, pero su administración directa en el APOm la inhibe. Por último, la activación de los receptores  $\kappa$  facilita o no modifica la lordosis. Teniendo en consideración lo anterior, es posible que los tres receptores participen en la regulación del despliegue de la conducta sexual femenina.

La importancia del sistema opioide endógeno en la regulación de la conducta sexual en hembras se extiende también en otro aspecto importante de ésta, como lo son las propiedades reforzantes de la cópula.

Tabla 1. Efecto de ligandos que se unen a los receptores a opioides y la conducta sexual en hembras. (-): inhibición, (+): facilitación, CR: cópula regulada, CnoR: cópula no regulada.

Fármaco	Admón.	Estado hormonal	Condición	Efecto	Referencia
DAMGO (agonista $\mu$ )	ICV	OVx BE o BE +P <sub>4</sub>	CR	(-) Lordosis sólo en el grupo con P <sub>4</sub> . Sin cambios en la proceptividad	(Pfaus & Pfaff, 1992)
DPDPE (agonista $\delta$ )	ICV	OVx BE o BE +P <sub>4</sub>	CR	(+) Lordosis en ambos tratamientos hormonales, facilitó la proceptividad en el grupo con P <sub>4</sub> .	(Pfaus & Pfaff, 1992)
U50-488 (agonista $\kappa$ )	ICV	OVx BE o BE +P <sub>4</sub>	CR	(+) Lordosis con, y en ausencia de P <sub>4</sub> , no modificó la proceptividad.	(Pfaus & Pfaff, 1992)
DPDPE (agonista $\delta$ )	APOm	OVx Pulsos de BE	CnoR	(-) Lordosis, efecto prevenido con la administración del antagonista naltrindol. Sin cambios en la proceptividad	(Sinchak <i>et al.</i> , 2004)
Endomorfina 1 y 2 (agonistas $\mu$ )	ICV	OVx. BE + P <sub>4</sub>	CnoR	(-) Lordosis, efecto prevenido con la administración de naloxona. No evaluaron la proceptividad	(Acosta-Martinez & Etgen, 2002)
Naloxona (antagonista $\mu$ y $\delta$ no selectivo)	APOm e HVM	OVx. Dosis subóptima de BE +P <sub>4</sub>	CnoR	(+) Lordosis en APOm, sin efecto en el HVM. Sin evaluación de la proceptividad	(Acosta-Martinez & Etgen, 2002)
DAMGO (agonista $\mu$ )	APOm e HVM	OVx. BE+P <sub>4</sub>	CnoR	(-) Lordosis. No evaluaron la proceptividad	(Acosta-Martinez & Etgen, 2002)
Dinorfina 1- 9 (agonista $\kappa$ )	ICV	OVx BE+P <sub>4</sub>	CnoR	Sin efecto sobre la lordosis. La proceptividad no fue evaluada	(Pfaus & Gorzalka, 1987)

### **1.9.2 Opioides y conductas reforzantes**

El estado de afecto positivo se considera análogo al placer en humanos (Ágmo, 1999) y se establece tras la ejecución de una conducta con propiedades reforzantes. Como ya se mencionó, la importancia de que una conducta tenga consecuencias reforzantes es que tiene mayores posibilidades de su repetición (Paredes, 2014). Se ha encontrado que los opioides endógenos participan en el establecimiento de este estado de afecto positivo en la conducta sexual y en otras conductas que son reforzantes. Por ejemplo, la actividad física aeróbica voluntaria se relaciona con estados de afecto positivo en roedores y con liberación de opioides endógenos que a su vez, activan a los subtipos de receptores a opioides  $\mu$ ,  $\kappa$  y  $\delta$  en diversas áreas cerebrales como la corteza piriforme, la AMG bl, la AMG Me, y el giro dentado del hipocampo (Arida *et al.*, 2015). Esta activación acompaña también con cambios inmediatos en la expresión de los genes que codifican para los tres precursores de los ligandos endógenos PENC, PDIN y POMC; así como de los receptores tipo  $\mu$ ,  $\kappa$  y  $\delta$  en el miocardio de ratas macho, lo que se ha relacionado con la función cardioprotectora dada por el ejercicio aeróbico (Dickson *et al.*, 2008).

En relación a la cópula (Agmo & Paredes, 1988), el bloqueo de los subtipos de receptores de opioides, mediante la administración sistémica de antagonistas inespecíficos como la naloxona, evita el desarrollo del estado de afecto positivo, inducido por la cópula (Paredes & Martínez, 2001).

Los opioides endógenos juegan un papel en el reforzamiento producido por la conducta sexual en ambos sexos. Por ejemplo, en ratas macho que presentan una eyaculación, se activan los receptores opioide tipo  $\mu$  y se internalizan en el APO, estos eventos son mimetizados con la administración del agonista DAMGO en el tercer ventrículo, y pueden bloquearse con la administración sistémica de naloxona (Coolen *et al.*, 2004). En un estudio posterior se evaluó en ratas macho por inmunofluorescencia, la colocalización de  $\beta$ -arrestina 2 y los receptores a opioides tipo  $\mu$  o  $\delta$  en el ATV a las 24 horas posteriores a una o seis eyaculaciones, así como en

machos sexualmente saciados. La colocación de  $\beta$ -arrestina 2 con el receptor de tipo  $\mu$ , fue mayor en machos sexualmente saciados que en aquellos que presentaron una sola eyaculación; mientras que la colocalización con el receptor tipo  $\delta$  fue mayor solo en el grupo que eyaculó una vez, lo que sugiere que la internalización de los receptores, especialmente los de tipo  $\mu$  se internalizan de manera proporcional a la actividad copulatoria ejecutada (Garduño-Gutiérrez *et al.*, 2013b). Otra evidencia de la relación de los opioides endógenos y la saciedad sexual es que la administración de naloxona, produce la reanudación de la conducta copulatoria en ratas macho sexualmente saciadas (Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1995). Adicionalmente, la administración de naltrexona antes de la actividad sexual, evita el establecimiento de la saciedad sexual (Garduño-Gutiérrez *et al.*, 2013a).

En hembras, la relación entre el sistema opioide y la conducta sexual se ha situado en diversas áreas cerebrales relevantes en la regulación de la esta conducta y en el establecimiento de las propiedades reforzantes de la cópula, incluyendo estructuras que forman parte de la red de toma de decisiones sociales (figura 5), como son el APOm, la AMG y el HVM (García-Horsman *et al.*, 2008; Paredes, 2014). A continuación se describe brevemente el papel de estas estructuras en la conducta sexual femenina, así como en el reforzamiento sexual en hembras.

### **1.9.3 Área preóptica media**

El APOm se localiza en el hipotálamo, en la porción más caudal del quiasma óptico, a lo largo del tercer ventrículo y debajo de la comisura anterior (Paredes, 2003; O'Connell & Hofmann, 2011a). Está limitada rostralmente por la estría terminal y dorsalmente se continúa con la porción media del hipotálamo (Paredes, 2003). Esta estructura parece crucial para integrar la conducta sexual masculina y algunos aspectos de la femenina (Ágmo, 2007b). Además, interviene en varios procesos tales como la termorregulación y otras conductas como la parental y la agresiva en ambos sexos (O'Connell & Hofmann, 2011a). El APOm contiene receptores a

estrógenos y P<sub>4</sub>, y su lesión, ya sea electrolítica o neurotóxica, favorece el despliegue de la posición de lordosis en ratas y hámsteres, cuando se administran dosis subóptimas de E<sub>2</sub> en la condición de CnoR (Powers, 1972; Hoshina *et al.*, 1994). En contraparte, la estimulación eléctrica de esta área inhibe la receptividad en ratas (Pfaff & Sakuma, 1979), por lo que se consideraba que, la activación del APOm inhibía la conducta sexual en hembras. No obstante, la lesión del APOm sobre la conducta sexual femenina en la condición de CR, mostró que las hembras no pasaban al compartimento del macho, a pesar de facilitar la respuesta de lordosis (Whitney, 1986). Este resultado sugería que el APOm también podría vincularse con los aspectos motivacionales o apetitivos de la conducta sexual y no solamente a la receptividad, y denotaba la importancia de la condición de cópula en los estudios de conducta sexual en hembras ya que en la mayoría de los estudios al respecto, la evaluación de la conducta sexual se restringe a la receptividad y se realiza en condición de CnoR. La evaluación de la proceptividad se omite en varios casos, por lo que la participación del APOm en el control de la proceptividad no es concluyente, ya que en un estudio en el que lesionaron el APOm con ácido iboténico produjo una reducción en la proceptividad (Hoshina *et al.*, 1994), mientras que en otro, una lesión similar no tuvo efecto sobre ella (Guarraci & Clark, 2006).

Por otro lado, se ha encontrado que, tras una hora de CR, se produce la activación del APOm (entre otras áreas tales como el núcleo de la base de la estría terminal, el HVM y la AMG Me y el núcleo paraventricular del hipotálamo) en hembras, medida por la expresión del ARNm del gen de expresión temprana c-fos (Pfaus *et al.*, 1993). Otra investigación reveló que, en la CnoR también existe una expresión a la alza de c-fos y de otros genes de expresión temprana, pertenecientes a la familia *Jun* (Flanagan-Cato & McEwen, 1995). Lo anterior indica la activación de estos grupos neuronales tras la cópula. Esta activación es inespecífica, ya que tanto reportes de CR, CnoR, así como de estimulación mecánica de la vagina y cérvix, encuentran el aumento en la expresión del gen para c-fos en hembras tratadas con E<sub>2</sub> y

P<sub>4</sub>, lo que pudiera indicar que el APOm, y las otras áreas que se activan por la cópula, participan en el procesamiento de información relacionada con la actividad sexual de diversa índole como la somatosensorial y la motivacional, independientemente de las consecuencias reforzantes o no de esta información. Ésto queda sustentado en un estudio hecho por Mayte Parada y colaboradores, quienes aplicaron diferentes esquemas de estimulación en el clítoris a cada grupo experimental de ratas hembra. El primer grupo recibió una estimulación clitoridiana cada segundo, durante un minuto; mientras que el otro consistió en una estimulación cada 5 segundos, por un minuto. En ambos casos, repitieron los ciclos de estimulación 5 veces y determinaron si alguno de los patrones generaba el estado de afecto positivo, evaluándolo en el paradigma de CPL (Parada *et al.*, 2010). A pesar de que ambos tipos de estimulación clitoridiana, produjo el aumento en la expresión de c-Fos en varias regiones cerebrales tales como la corteza piriforme, el NA, el núcleo arcuato, el HVM y el APOm; la estimulación espaciada (cada 5 segundos) produjo una mayor expresión de c-Fos en el APOm y fue el único esquema de estimulación que produjo el cambio de preferencia de lugar condicionado. Otro estudio que vincula el APOm con el estado de afecto positivo es el que mostró que, la administración directa de naloxona en el APOm, bloquea la inducción de este estado tras 1 h de CR, evaluado en el paradigma de CPL (García-Horsman *et al.*, 2008).

Tomando en consideración los resultados anteriores, el APOm es un área relevante para el despliegue de la conducta sexual en la rata hembra, tanto en el procesamiento de la información recibida durante la cópula como en las consecuencias reforzantes de la misma.

#### **1.9.4 Hipotálamo ventromedial**

Se localiza posterior al APOm, a lo largo del tercer ventrículo, en la porción más inferior del lóbulo temporal. El HVM además de ser otro sitio clave en la regulación de la conducta sexual femenina, participa en la modulación de otras conductas tales como la alimentaria, la agresiva y la maternal (O'Connell & Hofmann, 2011a). Esta estructura contiene receptores

a estrógenos y P<sub>4</sub> y es crucial para la expresión de la conducta sexual en hembras, ya que la sola administración de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>, en el núcleo ventromedial del hipotálamo es suficiente y necesaria para la inducción completa de la receptividad y proceptividad en ratas ovariectomizadas (Pleim *et al.*, 1989). Por otro lado, la disminución de los receptores a P<sub>4</sub>, mediante la administración de oligonucleótidos antisentido, reduce la lordosis y la proceptividad de manera notoria, en la condición de CnoR (Etgen & Barfield, 1986; Ogawa *et al.*, 1994). Asimismo, la depleción de los receptores a estrógenos  $\alpha$  (ER  $\alpha$ ), tras la administración de un ARN silenciador acoplado a un adenovirus, disminuye ambos componentes de la conducta sexual en la rata hembra (Ribeiro *et al.*, 2012; Musatov *et al.*, 2006). Finalmente, la lesión electrofónica directa o el seccionamiento de las conexiones laterales del HVM reduce la receptividad en ratas en la condición de CR y CnoR (Mathews & Edwards, 1977; Clark *et al.*, 1981), mientras que la estimulación eléctrica del HVM facilita la receptividad en hembras en CnoR (Pfaff & Sakuma, 1979). Se ha sugerido que el HVM es importante regulando la proceptividad en diferentes especies, incluyendo primates, ya que la estimulación eléctrica del HVM en la hembra del macaco, produce el despliegue de proceptividad ante la presencia del macho (Koyama *et al.*, 1988; Ágmo, 2007b).

Como sucede con el APOm, la cópula durante una hora, produce la activación del HVM, evaluada por el aumento del ARNm del gen de expresión temprana c-Fos (Pfaus *et al.*, 1993); mientras que, la administración de opioides y opiáceos en esta área cerebral inhibe la conducta sexual en ratas hembra (Pfaus & Gorzalka, 1987; Le Merrer *et al.*, 2009), y la administración de naloxona en el HVM bloquea la preferencia de lugar condicionada inducida por la CR (García-Horsman *et al.*, 2008).

### **1.9.5 Amígdala**

La AMG es una estructura, compuesta de 13 núcleos en la porción más caudal del lóbulo temporal que se relaciona con numerosas estructuras cerebrales (Baxter & Murray, 2002). La participación de la AMG en la conducta sexual varía dependiendo de la región que se evalúe, por lo que se

considera como un sitio de modulación donde se integran estímulos de diversa índole para ejecutar una respuesta (Mascó & Carrer, 1980). Por ejemplo, la lesión por electrocoagulación (con un pulso de corriente continua de 1 mA durante 30 segundos) de la porción anterior de la AMG, disminuye la presentación de la lordosis, mientras que la estimulación electroquímica (con depósitos de hierro mas un pulso de corriente de 100µA durante 30 segundos) favorece la lordosis. Por otro lado, el mismo tipo de lesión en la porción posterior tiene el efecto contrario en ratas hembras ovariectomizadas y tratadas con E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> (Mascó & Carrer, 1980).

La AMG recibe información somatosensorial y la estimulación vaginocervical produce su activación, evaluada por la expresión aumentada de c-Fos (Tetel *et al.*, 1993). La AMG también integra información olfativa, siendo una estructura importante en el procesamiento de olores sexualmente relevantes. La lesión por radiofrecuencia (a 52°C durante un minuto) de la AMG media reduce el tiempo de olfateo al compartimento de un macho intacto, en hembras a quienes se administró dosis subóptimas de BE (5µg), mientras que no hay cambios con la administración de dosis óptimas BE y P<sub>4</sub>. Los autores concluyeron que la lesión de la AMG en hembras produce la disminución en la preferencia por un macho sexualmente intacto. También encontraron que esta lesión no afectó la receptividad ni la proceptividad en la condición de CR (Kondo & Sakuma, 2005). Por último, la AMG, al igual que el APOm y el HVM está involucrada en el carácter reforzante de la CR, ya que la administración en esta estructura de naloxona inhibe la preferencia de lugar condicionada inducida por la CR (García-Horsman *et al.*, 2008).

Una consecuencia importante de la conducta sexual es que induce cambios plásticos permanentes en el cerebro adulto, principalmente cuando ocurre en la condición de CR. Hembras que copulan durante una hora muestran un aumento en el número de células nuevas adultas generadas en la zona subventricular, que viajan a través de la vía migratoria rostral para integrarse a la capa celular interna del bulbo olfatorio accesorio (BOA) 15

días después de desplegar la conducta sexual (Corona *et al.*, 2011; Corona *et al.*, 2016). La repetición de la cópula (4 sesiones, una cada 5 días) produce además de un incremento mayor en el número de células en el BOA que el observado por una sola sesión, un aumento de la neurogénesis en la capa granular del bulbo olfatorio principal. Estos resultados sugieren que la repetición de la cópula puede inducir cambios plásticos más robustos (mayor número de células y neuronas), y la liberación de opioides endógenos se han involucrado en este fenómeno de proliferación y supervivencia celular producido por la cópula (Arzate *et al.*, 2013).

## II. Justificación del problema

El sistema opioide endógeno participa en diversos procesos neuroendócrinos relacionados con la conducta sexual femenina y con el estado de afecto positivo relacionado con las propiedades reforzantes de la cópula en ciertas áreas cerebrales, como el APOm, el HVM y la AMG, que se activan tras el despliegue de la conducta sexual. Asimismo, el sistema opioide está involucrado en la saciedad sexual y en el efecto *Coolidge* en machos. En hembras, la saciedad sexual se ha propuesto como la disminución de la proceptividad y el efecto *Coolidge* como el aumento en la frecuencia de estas conductas tras la presentación de un macho desconocido. No obstante, otros componentes de la conducta sexual podrían verse modificados ante la presentación de una pareja sexual novedosa, tales como la motivación sexual incentiva y la preferencia de pareja. A pesar de la existencia de algunos trabajos sobre la saciedad sexual y efecto *Coolidge* en hembras, es necesaria una aproximación sistemática que permita la conceptualización y posterior estudio de los mediadores químicos, así como los circuitos involucrados en estos procesos en las hembras. Asimismo, se desconoce si la conducta sexual es un estímulo suficientemente intenso para inducir cambios en la expresión de genes que codifican para los receptores de opioides, en áreas cerebrales que son importantes tanto en la regulación

de la conducta sexual en hembras, como en el establecimiento del reforzamiento sexual.

### **III. Hipótesis general**

La conducta sexual en la rata hembra cambiará en relación a factores, como la presentación de una pareja sexual novedosa, reflejado en un efecto *Coolidge* y a la estimulación sexual que recibe durante la cópula continua, reflejado en un estado de saciedad sexual. Estos cambios conductuales se acompañarán de modificaciones fisiológicas que incluyen cambios en la expresión de genes que codifican para los receptores de opioides, en sitios cerebrales que son importantes, tanto en el despliegue de la conducta sexual, como en las propiedades reforzantes de la cópula.

#### **3. 1 Hipótesis particulares**

##### **Saciedad sexual**

1. La cópula continua durante la CR y la CnoR durante 4 horas consecutivas producirá la extinción de la proceptividad, que reflejará un estado de saciedad sexual en hembras, sin modificación en la receptividad sexual.
2. En la condición de CR por 4 h, aumentará gradualmente el tiempo de permanencia de la hembra en el compartimento neutro y disminuirá el número de cruces al compartimento del macho.

##### **Efecto *Coolidge***

3. La hembra presentará mayor motivación sexual incentiva por un compañero sexual novedoso, que por uno conocido, en el paradigma de motivación sexual incentiva.
4. La hembra mostrará una preferencia por un compañero sexual novedoso, que por uno con el que ya ha copulado, y copulará más con el macho novedoso, que con el conocido en el paradigma de preferencia de pareja.

### **Expresión genética**

5. Disminuirá la expresión del gen que codifica para el receptor de tipo  $\mu$  en el APOm y el HVM tras una hora de cópula regulada o no regulada a las 4, 12 o 24 posteriores.
6. Disminuirá la expresión del gen que codifica para el receptor  $\mu$  en el APOm tras una sesión de 4 horas de CR y CnoR.
7. Disminuirá la expresión del gen que codifica para el receptor de tipo  $\mu$ ,  $\kappa$  o  $\delta$ , tras cuatro sesiones de cópula de una hora cada una, regulada o no regulada, a las 24 horas posteriores a la cuarta sesión.

### **IV. Objetivos**

1. Estandarizar un paradigma que permita la descripción conductual de la saciedad sexual en la rata hembra, en condiciones de CR y CnoR.
2. Evaluar el efecto de la novedad sexual sobre la motivación sexual incentiva y preferencia de pareja en la rata hembra.
3. Determinar si tras una sesión de cópula de 1 hora (CR y CnoR) se modifica la expresión del gen para el receptor a opioide de tipo  $\mu$ , en el APOm y el HVM, a diferentes tiempos: a las 4, 8 y 24 horas posteriores al despliegue de la conducta.
4. Evaluar si tras una sesión de cópula de 4 horas (CR y CnoR) hay cambios en la expresión del gen que codifica para el receptor a opioide de tipo  $\mu$  en el APOm.
5. Determinar si 4 sesiones (una cada cinco días) de 1 hora de cópula, regulada o no, inducen cambios en la expresión de genes que codifican para los receptores de tipo  $\mu$ ,  $\kappa$  y  $\delta$  en APOm, HVM y AMG.

### **V. Materiales y métodos**

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar hembras y machos de 12-16 semanas de edad. Los animales fueron alojados en grupos de 3-4 por caja, en condiciones generales de laboratorio, con libre acceso a agua y alimento,

y bajo un ciclo invertido de 12 horas de luz / 12 horas de oscuridad. La fase oscura inició a las 10:00. Todos los machos fueron sometidos a pruebas de cópula de entrenamiento y se utilizaron sólo aquellos sexualmente experimentados en cada prueba (con latencias de eyaculación menores a 15 minutos en tres sesiones de entrenamiento consecutivas). Todas las pruebas de cópula se realizaron durante las primeras 4 horas de la fase oscura del ciclo de luz y de acuerdo con el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, NOM-062-ZOO-1999, de la Secretaría de Salud, que a su vez, cumple con los lineamientos de los Institutos Nacionales de Salud Norteamericanos (NIH).

### **5.1 Prueba de motivación sexual incentiva**

Esta prueba se realizó de acuerdo con lo expuesto por Anders Ågmo (2004). En una arena rectangular de 100 x 50 cm que tiene dos compartimentos laterales de 15 x 25cm, en los lados opuestos, en los que se colocan a los animales incentivos (figura 3). Estos compartimentos están conectados con la arena por medio de una malla, por lo que el sujeto experimental y los incentivos sólo pueden verse, escucharse y olerse. Frente a cada compartimento existe una zona virtual de 25 x 15 cm denominada <<zona incentiva>>. El tiempo de estancia en cada una de las zonas incentivas se registra mediante una cámara de video, conectada al programa Etho Vision Xt (versión 10.1). Las hembras fueron colocadas individualmente para su habituación a la arena en tres sesiones de 10 minutos cada una, durante tres días consecutivos y previos a la primera prueba. Los resultados de las pruebas 1 y 2 se promediaron para evitar el efecto de la preferencia de lugar, de acuerdo con Ågmo (2004) y se alternó la colocación de los sujetos incentivos en los compartimentos; mientras que en la tercera prueba, los incentivos se colocaron aleatoriamente para evitar el efecto mencionado.

### **5.2 Prueba de preferencia de pareja**

Se realizó en una caja hecha de madera (93 x 27x 32 cm), dividida en tres compartimentos (figura 4). El compartimento central (21 x 27 x 32 cm) se comunica con dos laterales de 36 x 27 x 32 cm, por medio de compuertas

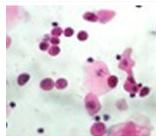
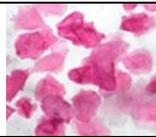
removibles. En los compartimentos laterales se colocó a los machos empleados como estímulo, sujetos por un arnés. Los machos fueron previamente habituados a la sujeción en 3 sesiones diarias de 10 minutos, previas al día de la prueba, de tal forma que se acostumbraran al arnés y fueran capaces de desplegar la conducta copulatoria con él. Las hembras también tuvieron tres sesiones diarias (de 10 minutos cada una) de habituación en la caja vacía, los días anteriores a la prueba.

Al inicio de la prueba, se colocó a la hembra en el compartimento central con las compuertas laterales cerradas, mientras los machos se colocaron cada uno en su compartimento respectivo. Se dejó pasar un minuto tras el cual se retiraron las compuertas para permitir el libre paso de la hembra por la arena. Se registró el tiempo de estancia de la hembra en cada compartimento, así como los parámetros de la conducta sexual en los 15 minutos de prueba: número de montas, intromisiones y eyaculaciones recibidas por cada uno de los machos.

### **5.3 Experimento 1: evaluación de la saciedad sexual en hembras**

Se utilizaron 20 hembras de las cuales se llevaba el registro de sus ciclos estrales mediante la obtención de frotis vaginales. Se decidió utilizar hembras en proestro para darle continuación al trabajo previo sobre la proceptividad bajo la cópula continua (Ventura-Aquino & Fernández-Guasti, 2013). La toma de muestra del líquido vaginal se realizó con un gotero de vidrio con una pequeña gota de solución de cloruro de sodio (NaCl) al 0.9%. Se tomó a la hembra y se introdujo la punta del gotero cuidadosamente en la entrada vaginal para la toma de fluido. El contenido se colocó inmediatamente en un portaobjetos y fue observado al microscopio de luz con el objetivo de 10 x. Dependiendo de las características celulares se determinó la fase del ciclo estral, como se muestra en la tabla 2 (Goldman *et al.*, 2007).

Tabla 2. Características celulares del fluido vaginal en las fases del ciclo estral en la rata (Imágenes tomadas de Zenclussen et al. 2014). 0: ausentes, +: escasas, ++: moderadas, +++: abundantes.

Fase	Células redondas y nucleadas	Células cornificadas	Leucocitos	Ejemplo
Proestro	+++	0/+	0	
Estro	0/+	+++	0/+	
Metaestro	++	++	++	
Diestro	0/+	0/+	+++	

Sólo aquellas hembras (n=15) que presentaron dos ciclos regulares consecutivos fueron incluidas en el estudio y de manera aleatoria se incluyeron en uno de los dos grupos independientes: CR (n=7) y CnoR (n=8). Durante la fase de proestro siguiente, se colocó a la hembra en la arena de cópula (regulada o no) durante 5 minutos para habituación tras los cuales, se le presentó un macho sexualmente experimentado. Se permitió la cópula durante 4 horas. Todas las pruebas fueron videograbadas para su posterior análisis. Las conductas registradas fueron: orejeo, brincoteo-zigzaguo; latencia de monta (LM), latencia de intromisión (LI), latencia de eyaculación (LE), número de montas (#M), intromisiones (#I) y eyaculaciones (#E). Se calculó el intervalo interintromisión (III) dividiendo las latencias de eyaculación entre el #I para cada serie eyaculatoria.

En el caso de la CR, se registró, además, el porcentaje de salidas post-monta (SPM) y post-intromisión (SPI), las latencias de retornos post-monta (LRPM) y post-intromisión (LRPI); el tiempo de estancia en el compartimento neutro y el número de visitas al compartimento con el macho.

#### **5.4 Experimento 2: evaluación del Efecto Coolidge en hembras**

Se utilizaron 28 ratas hembra de la cepa Wistar a las que se les practicó una ovariectomía bilateral el día 0, utilizando como anestesia una mezcla de ketamina (Cheminova, DF, México) (95 mg / kg / i.p.) y xilazina (Cheminova) (12 mg / kg / i.p.). Tras 15 días de recuperación, se formaron 2 grupos independientes, uno para la condición de CR y otro para CnoR (n = 14 c/u). La receptividad sexual se indujo mediante la administración secuencial de 25 µg / rata / s.c. de BE (Sigma St. Lous, Missouri, USA) (-48 horas) y 1 mg / rata / s.c. de P<sub>4</sub> (Sigma) (-4 horas) previo a la prueba de cópula (Martínez & Paredes, 2001; Arzate *et al.*, 2011; Arzate *et al.*, 2013). Ambas hormonas fueron disueltas en aceite de maíz, en un volumen de 0.2 ml / rata. Se realizaron tres pruebas de cópula de 1 hora (este tiempo es suficiente para producir el estado de afecto positivo, con base en Arzate y cols, 2011) los días 15, 18 y 21, respectivamente, con un macho sexualmente experimentado (macho conocido, M CON). Al término de cada cópula se realizó una prueba de MSI que dura 10 minutos. Los incentivos utilizados en las primeras dos pruebas de MSI fueron: el M CON y un macho desconocido para la hembra (macho novedoso, M NOV). Para la última prueba de MSI, los sujetos se subdividieron en 4 grupos independientes (2 por cada condición) a los cuales se les presentó un incentivo social (hembra receptiva) y uno sexual (M NOV o M CON). Al término de esta prueba se realizó una prueba de PP (figura 7), en la que se colocó a la hembra en el compartimento central y tras un minuto de habituación, se abrieron las compuertas laterales. Se registraron los parámetros de conducta sexual previamente descritos y el tiempo de estancia en cada uno de los compartimentos durante los 15 minutos que duró la prueba.

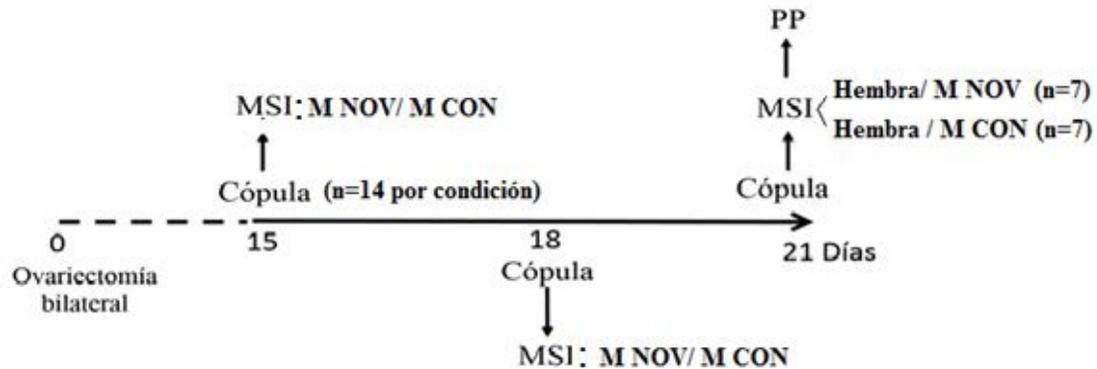


Figura 7. Diseño experimental empleado para estudiar el efecto *Coolidge* en hembras (para detalles véase texto).

### 5.5 Experimento 3: Conducta sexual y expresión genética de receptores a opioides

Se utilizaron 61 hembras ovariectomizadas y tras dos semanas de recuperación, se les indujo la receptividad sexual con el esquema ya mencionado. Para una aproximación inicial, se realizó una prueba piloto con nueve grupos independientes en los cuales se evaluó la expresión del gene para el receptor  $\mu$  en el APOm y en el HVM utilizando 3 horarios de sacrificio distintos:

- a) Control: los animales se colocaron en la arena de cópula dividida por una malla que sólo permitía que los sujetos se escucharan, olieran y vieran, sin mayor interacción física (n=6-7 para cada horario).
- b) Una sesión de CR de 1 hora (n=6 para cada horario)
- c) Una sesión de CnoR de 1 hora (n=8 para cada horario)

Al término de la prueba las hembras fueron alojadas individualmente hasta el momento del sacrificio por decapitación, el cual se realizó en tres horarios diferentes: a las 4, 12 o 24 horas después de la prueba. Estos horarios se seleccionaron tomando en consideración otros trabajos que han medido la expresión del gen que codifica para el receptor opioide tipo  $\mu$  (Brodsky *et al.*, 1995; Puehler *et al.*, 2004). Posterior a esta prueba piloto, se decidió obtener el tejido cerebral 24 horas después del término de las pruebas conductuales para los grupos de cópula repetida y para los grupos

de una sesión de 4 horas de cópula, formándose así dos grupos experimentales adicionales:

- d) Una sesión de CR de 4 horas (n =8), con su respectivo grupo control (n=8)
- e) Una sesión de Con R de 4 horas (n=8), con su grupo control (n=8)

Estos grupos se incluyeron para analizar los posibles cambios en receptores a opioides en hembras que tuvieron una mayor actividad sexual y que posiblemente se encontraban sexualmente saciadas.

Para cubrir el objetivo 5 (cópula repetida), 24 hembras con características similares al experimento anterior, distribuidas en los grupos control, CR y CnoR tuvieron 4 sesiones de 1 hora de cópula, cada cinco días, en los días 15, 20, 25 y 30 posteriores a la ovariectomía. Se seleccionó este intervalo de acuerdo con la duración del ciclo estral de la rata (LeFevre & McClintock, 1988) y con base en el protocolo de Arzate y cols. (2013). Las hembras fueron sacrificadas 24 horas después del término de la última sesión de cópula.

### **5. 6 Obtención de las áreas cerebrales de interés**

Para la disección de las áreas cerebrales a estudiar, se tomaron referencias anatómicas de acuerdo al atlas del cerebro de rata de Paxinos & Watson (1982) y la técnica utilizada anteriormente por Antaramian y colaboradores (Antaramian *et al.*, 2015). Inmediatamente después de la decapitación, se extrajo el cerebro y se colocó en una caja de Petri con hielo, con la cara ventral hacia arriba. Para obtener el bloque coronal que contenía las estructuras de interés, se realizaron cortes a mano alzada con una navaja, tomando las siguientes referencias anatómicas. Se obtuvo una rebanada gruesa con dos cortes coronales. El primero pasaba por el borde anterior de los cuerpos mamilares y sobre el quiasma óptico. El segundo se hizo detrás del primero, a 6 mm aproximadamente. Una vez separada esta rebanada, se colocó con la cara anterior hacia arriba. En este corte se visualizaba la comisura anterior como referencia (figura 8). Sobre este bloque

se realizaron dos cortes parasagitales, siguiendo el trayecto de los ventrículos laterales y un tercer corte horizontal que pasaba justo por debajo por la comisura anterior. De esta forma se obtenía un bloque cuboide. La mitad anterior de este bloque correspondió al APOm, y la posterior al HVM. Para obtener la AMG, en la porción sobrante de la rebanada se realizaron dos cortes parasagitales, siguiendo el trayecto de los nervios ópticos, otro corte sobre el eje axial que pasaba por el surco rinal y finalmente se retiraba la corteza parietal. Todos los tejidos se colocaron en un microtubo para centrífuga de 1.5 ml el cual contenía 60  $\mu$ l de solución *RNA later*<sup>®</sup> (Foster, CA, EUA). Las muestras fueron congeladas a -70 °C hasta su procesamiento.

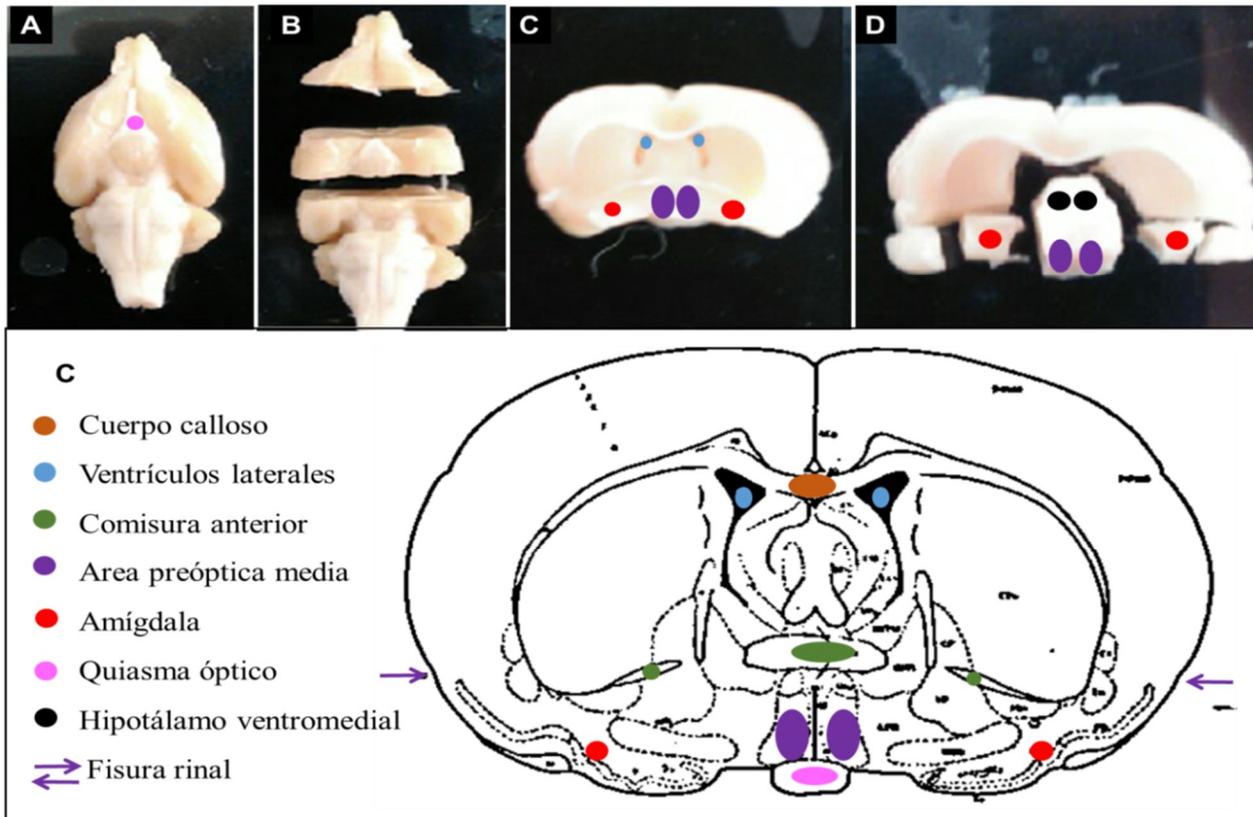


Figura 8. Imagen representativa de la obtención de las áreas estudiadas. A) vista ventral del cerebro B) límites del bloque que contiene las áreas de interés C) corte coronal del bloque. Se muestra debajo un diagrama indicando las estructuras de referencia D) Se muestran los bloques finales que contienen las áreas.

### **5.7 Extracción y purificación de ácido ribonucleico (ARN)**

La purificación de ARN total se realizó siguiendo el protocolo del *SV total RNA Isolation System* (Madison, WI, EUA). El tejido se colocó en un microtubo de 1.5 ml con 175 µl de solución de lisis (RLA, tiocianato de guanidina en Tris pH 7.5 +1 ml de beta mercaptoetano). El tejido se homogenizó con un pistilo y se agregaron 350µl de amortiguador de dilución (RDA), se mezcló por inversión y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a un microtubo nuevo y se le adicionaron 200µl de etanol al 100%. Se mezcló por inversión y la mezcla se pasó a una minicolumna de sílica contenida en un tubo de recolección y se centrifugó a 12000 rpm durante 1 minuto. Se desechó el eluido. Se realizó un lavado con 600µl de solución de lavado (RWA, acetato de potasio + Tris-HCl pH 7.5) y nuevamente se centrifugó a 12000 rpm por un minuto. Se descartó el eluido y se agregaron 50µl de la mezcla de incubación de ADNasa (DSA, tiocianato de guanidina en tris - HCl, pH 7.5). Se centrifugó a 12000 rpm durante 1 minuto. Se hicieron dos lavados más con 200 µl de RWA y se dejó secar la columna centrifugando a 12000 rpm durante 2 minutos. La columna se transfirió a un tubo nuevo al cual se le agregaron 50µl de agua con inhibidor de ribonucleasas, se dejó incubar por un minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 rpm, obteniéndose el ARN total. La integridad del ARN obtenido se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Sólo se utilizaron aquellas muestras en las que los geles mostraban las bandas correspondientes al ARN ribosomal de las subunidades 28 S y 18 S (figura9). En caso de que ambas bandas no se observaran nítidamente, se consideró el ARN como degradado y se descartaba esa muestra. Cabe mencionar que durante el proceso de disección de las áreas cerebrales, en contados casos se perdieron áreas debido a fallas en la técnica de disección, a pérdida de tejido o a la degradación del ARNm; quedando el número de sujetos final como se indica en la gráfica de resultados en la sección siguiente.

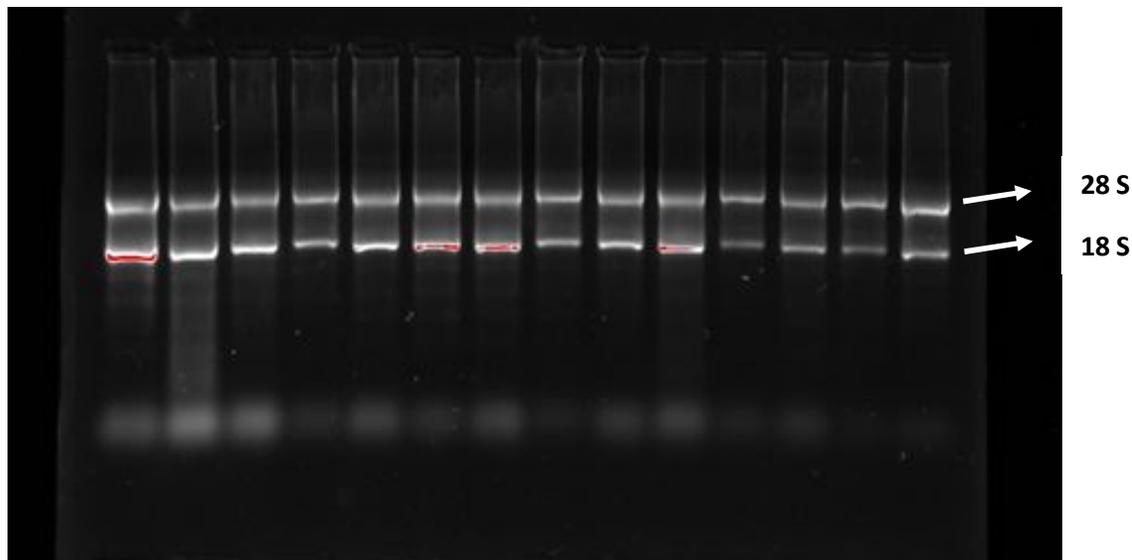


Figura 9. Imagen representativa de un gel de agarosa al 1% expuesta a luz ultravioleta. Se muestra en cada columna el ARN obtenido de cada muestra. Se confirma la integridad del ARN al observarse claramente las bandas correspondientes a las subunidades 28s y 18s ribosomales.

### 5.8 Síntesis de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc)

La concentración y la pureza del ARN obtenido se analizaron mediante un equipo de espectrofotometría Nanodrop, Thermo Scientific (Wilmington, DE, EUA). El ADNc se sintetizó tomando 1µgde ARN de cada muestra la cual se colocó en un microtubo de 200µl al cual se agregó 1µl de oligonucleótido antisentido a 10 mM (oligodTTP), 1µl de oligonucleótidos dNTPs, 5mM, 8µl de amortiguador FS (first strand, 5X) y agua libre de ribonucleasas c.b.p. 39µl. Por último, se agregó 1µl de la enzima RT-superscript II (Foster, CA, USA). La mezcla se colocó en un termociclador MJ Mini personal thermal cycler, BIORAD (Hercules, CA, EUA) y se programó a 40 ciclos de 42°C (desnaturalización) y 70°C (temperatura para la actividad de la enzima). Al término del cual el ADNc se colocó en hielo y se realizaron diluciones 1:3 con agua libre de ribonucleasas, las cuales se conservaron en refrigeración a -20°C hasta su uso.

### 5.9 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

El estudio de la expresión genética ha sido posible gracias a la evolución de técnicas clásicas como la reacción en cadena de la polimerasa

(PCR) punto final, dando origen a la PCR en tiempo real o cuantitativa (q-PCR). El fundamento de la técnica de q-PCR en tiempo real es el mismo que la PCR clásica pero con la ventaja de medir cuantitativamente la expresión de un gen en particular y así permite detectar posibles cambios en la expresión de genes después de algún tratamiento o condición. Se logra mediante la amplificación del ADN molde en el tejido a estudiar, el cual es reconocido por una cadena de oligonucleótidos diseñados para acoplarse específicamente al gen de interés (tabla 3). Para ello, previamente se debe aislar el ARN total del tejido a estudiar, posteriormente se realiza una transcripción reversa para obtener el ADNc el cual está listo para someterse a la q-PCR. La cuantificación puede hacerse con el empleo de colorantes fluorescentes, como el *SYBR Green* (Roche, Mannheim, Alemania).

La amplificación y cuantificación del ARN mensajero (ARNm) de los genes que codifican para los receptores opioide  $\mu$ ,  $\kappa$ ,  $\delta$  se llevó a cabo siguiendo un protocolo del *Light Cycler® Fast Start DNA Master SYBR Green I*, (Roche). De acuerdo al cual, en cada capilar se adicionaron 3 $\mu$ l de agua libre de ribonucleasas, 1 $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1 $\mu$ l de oligonucleótidos sentido y antisentido de los genes de interés (5 $\mu$ M), 1 $\mu$ l del *Light Cycler® Fast Start reaction mix SYBR Green I* (10X) y 3 $\mu$ l de ADNc de cada muestra. Cada reacción se llevó a cabo por triplicado, agregando en cada corrida un control negativo y una de las diluciones usadas en la curva estándar (véase más adelante).

Se realizaron las q-PCR para los genes caseros de ciclofilina A (CycA), superóxido dismutasa 2 (SOD2) y el de la proteína de activación de la tirosina 3-monooxigenasa (YWhaz) para cada condición y horario. Estos genes se escogieron porque se ha mostrado que son de los más estables en tejido nervioso, al ser empleados en la técnica de q-PCR en tejido cerebral (Bonefeld *et al.*, 2008; Nelissen *et al.*, 2010; Seol *et al.*, 2011; Soebadi *et al.*, 2016). Los valores obtenidos de estas q-PCR se procesaron mediante el software *Norm Finder* (Departamento de Medicina Molecular del Hospital de

Aarhus, Dinamarca) para encontrar la combinación de los dos genes caseros más estables para cada área cerebral estudiada. Se calculó la media geométrica (Mgeom) de esa combinación la cual se empleó para la normalización de datos, la cual se explicará en la sección que sigue.

Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados como cebadores o *primers* para la q-PCR, número de identificación (ID) en el banco de genes (*Gene bank*), así como la concentración a partir de la cual se realizaron las diluciones seriadas (1:10) para construir las curvas de concentración estándares. El diseño de los oligonucleótidos se hizo mediante el *software* Oligo 7.

<b>Gen</b>	<b>Oligo sentido (5'-3')</b>	<b>Oligoantisentido (5'-3')</b>	<b>ID Gene Bank</b>	<b>ng/<math>\mu</math>l</b>
CycA	AGC ACT GGG GAG AAA GGA TT	AGC CAC TCA GTC TTG GCA GT	25578	18
SOD2	TGGACAAACCTGAG CCCTAA	GACCCAAAGTCACGC TTGATA	24787	21.96
YWhaz	TTG AGC AGA AGA CGG AAG GT	GAA GCA TTG GGG ATC AAG AA	25518	12.03
$\mu$	CAG CCC TTC CAT GGT CAC AG	TAC TGG TCG CTA AGG CGT CTG	25601	47.73
$\kappa$	CAT CAC CGC TGT CTA CTC TG	AAT GTA GCG GTC CAC ACT CA	29335	42.60
$\delta$	GCT GTG CTC TCC ATT GAC T	CAC CTGAAG CCA AGA CCC	24613	39.03

Las condiciones de la q-PCR fueron las mismas para todos los genes y consistió en:

- a) Desnaturalización a 95°C, 10 minutos
- b) 45 ciclos de amplificación:
  - 95°C → 10 segundos
  - 68°C → 10 segundos
  - 72°C → 12 segundos
- c) Alineamiento a 55°C
- d) Enfriamiento a 40°C

Se confirmó que para cada par de oligonucleótidos correspondientes a cada gen, se obtuviera un producto único (figura10). La identidad de cada uno de los productos de la q-PCR se confirmó mediante su secuenciación utilizando la técnica de terminación con el *Byg Dye* (Applied Biosystems,

Foster, CA, EUA) usando el secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA). La secuencia obtenida fue cotejada con la base de datos publicada en el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, por sus siglas en inglés) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>), confirmando que todos los productos de PCR, correspondían a los mensajeros de interés (figura 11).

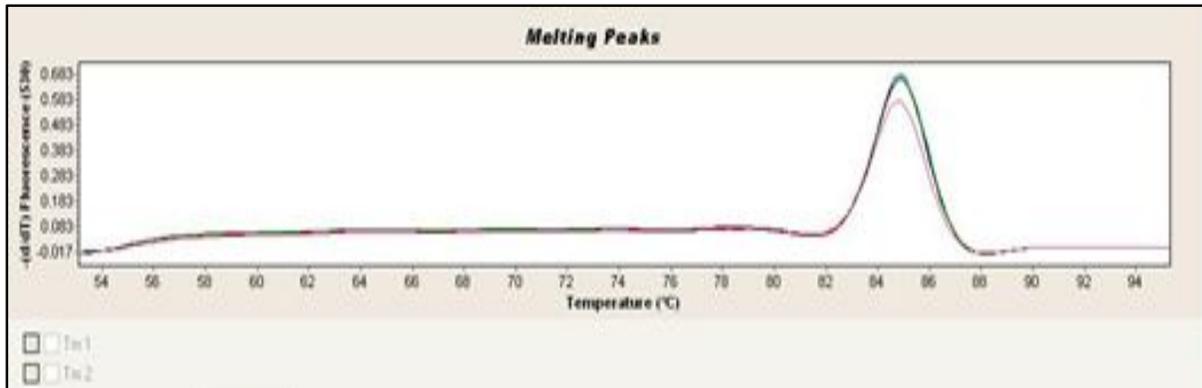


Figura 10. Imagen representativa que muestra el pico de fluorescencia obtenido (eje y) a una temperatura dada (eje x), confirmando así la obtención de un producto único de q-PCR para cada gen estudiado

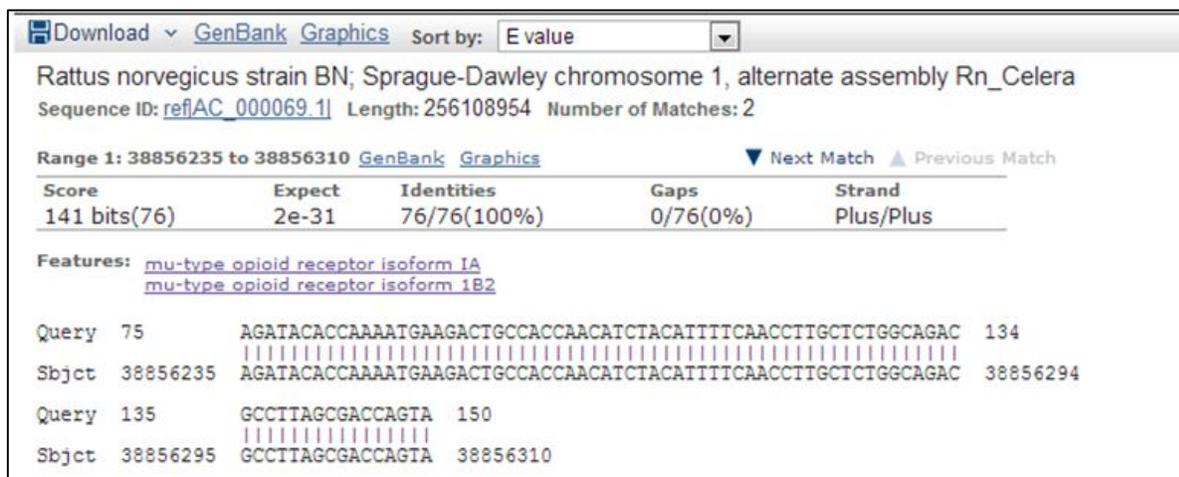


Figura 11. Se ejemplifica el cotejo de la secuencia de cada producto de la q-PCR, con aquella almacenada en el banco de genes, las cuales deben ser homólogas al 100%, esto se realiza con la herramienta de búsqueda local básica de alineación (*Basic Local Alignment Tool*, BLAST), que se encuentra en el banco de genes (Gene Bank).

### 5.10 Cuantificación relativa

Este método consiste en conocer la concentración de una solución con ADNc, interpolando el valor de la fluorescencia emitida, con una curva estándar construida con antelación (Life technologies, 2012). Estas curvas (una para cada gen) se construyen a partir de una solución de la cual sabemos su concentración (tabla 3), de la cual se obtienen al menos 3 diluciones seriadas (con un factor de dilución 1:10 entre ellas). Cada una de estas diluciones formará un punto en cada curva, y los puntos de cada curva se echan a andar en una corrida de q-PCR (figura 12, panel a). Al término de la q-PCR, se obtienen los valores de fluorescencia de cada dilución y el CP (figura 12, panel b). Con estos valores se grafica la curva, colocando en el eje de las x valor de los CP obtenidos, y en el eje de la Y el logaritmo de la concentración de cada punto. Al término, se obtiene el valor de la  $R^2$  y su respectiva ecuación con la función <<ecuación de la recta>>:

$$y = m x + b$$

Donde:

y= logaritmo de la concentración;

m= pendiente de la curva ( $3.3 \pm 0.3$ );

x= el valor del CP;

b= la intersección en el eje Y

Para considerarse como una curva estándar válida, el valor de la  $R^2$  debe ser lo más cercana a 1, y la pendiente de cada una de las curvas debe ser lo más cercana a 3.32 ( $\pm 0.3$ ) lo que indica que, cada 3.32 ciclos, hay un incremento logarítmico de la concentración en cada punto de la curva, lo que a su vez que corresponde al factor de dilución, 1:10 ( $1 \times 10^{-1}$ ); 1:100 ( $1 \times 10^{-2}$ ); 1:1000 ( $1 \times 10^{-3}$ ), etc. (figura 12, panel c). La figura 13 muestra las curvas que se utilizaron en este trabajo así como la ecuación de cada una.

Una vez que se tienen todas las curvas estándares, se echan a andar las q-PCR de las muestras experimentales. En cada corrida se agrega un

control negativo (sin ADNc) y una de las diluciones usadas en la curva estándar, de tal manera que el equipo interpole, al final de cada corrida, este punto de la curva, a la ya previamente almacenada en él y así, coteje los valores de los CP de las muestras experimentales para calcular su concentración (ng/μl). Lo anterior se hace despejando el valor de X de la ecuación (log [muestra]), sustituyendo el resto de los valores a partir de cada ecuación y al resultado se le calcula la función inversa (potencia), de tal manera que obtenemos el resultado en ng/μl.

Los cambios en la expresión de genes se pueden evaluar por medio de la comparación del ARNm del gen estudiado, en relación a una muestra de referencia (genes caseros). Estos resultados se muestran en unidades relativas con respecto al grupo control y este resultado puede ser positivo o negativo, dependiendo de si la expresión aumenta o disminuye. La normalización de datos se hace obteniendo la concentración de los mensajeros de cada muestra en ng/μl. Hay un consenso en normalizar los resultados respecto a un calibrador (grupo control) debido a que la técnica de q-PCR es muy sensible a variaciones durante la ejecución de la técnica (Life Technologies, 2012; Antaramian et., al 2015). La normalización de datos se hace con los datos de cada muestra y después se calcula la relación que existe con respecto al grupo control de la siguiente manera (Life technologies, 2012):

$$\frac{\text{Gene blanco (muestra x) ng/}\mu\text{l}}{\text{M geom de los genes caseros (muestra x) ng/}\mu\text{l}} = \text{cociente (muestra a)}$$

$$\frac{\sum \text{Cocientes del grupo control}}{\text{Número de muestras del grupo control}} = \overline{X}$$

Cociente de cada muestra de los grupos experimentales  $\div \overline{X} =$  Niveles del ARNm en unidades relativas con respecto al control

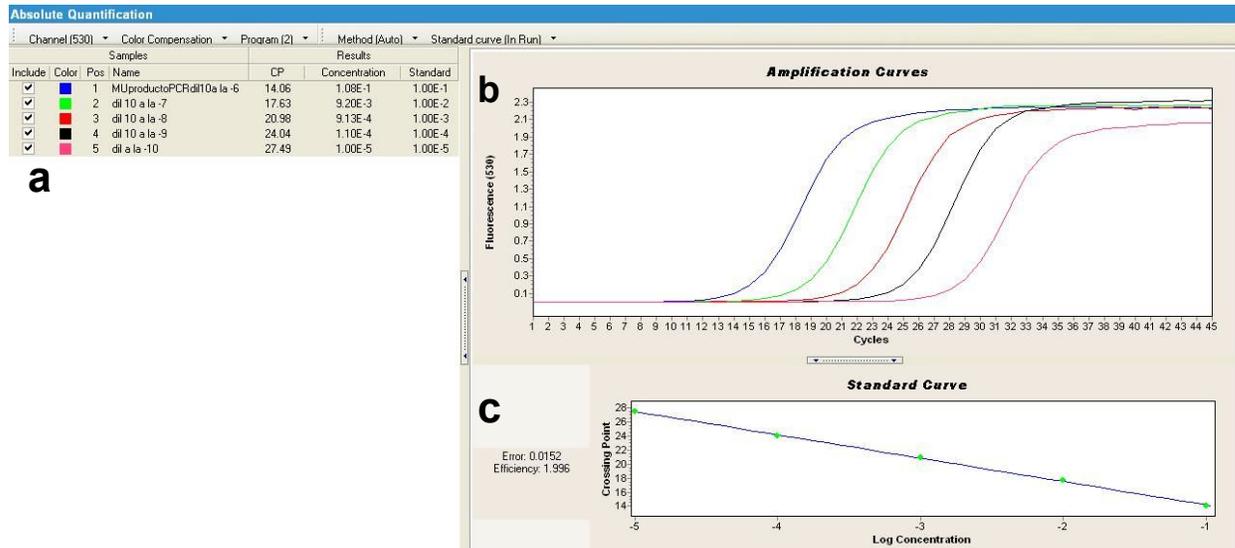


Figura 12. Imagen representativa de la obtención de una curva estándar de q-PCR. A partir de diluciones seriadas con factor de dilución 1:10 (panel a), se obtienen los ciclos a los cuales se rebasa el umbral de fluorescencia (panel b). Con estos valores se construye una recta (panel c) la cual debe tener una pendiente de 3.32 y una  $R^2$  de lo más cercana a 1 para considerarse como curva estándar.

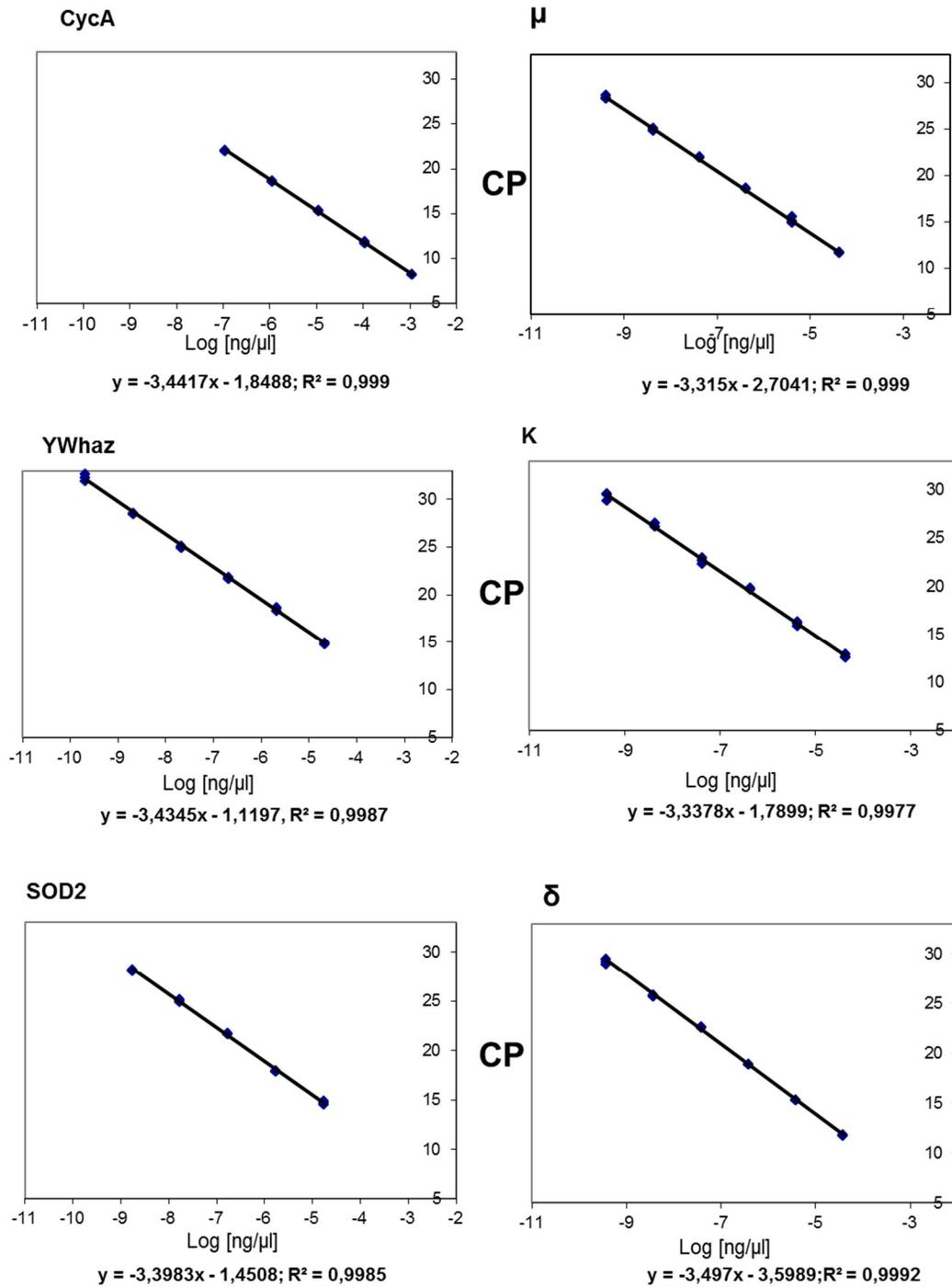


Figura 13. Curvas estándar utilizadas para la cuantificación de los ARN mensajeros de los genes de interés.

## VI. Resultados

### 6.1 Sacidad sexual

La tabla 4 muestra la conducta sexual desplegada en ambas condiciones experimentales a lo largo de las 4 horas de prueba. Se compararon ambas condiciones mediante una prueba de U-Mann Whitney debido a que los datos no tuvieron una distribución normal. Las hembras bajo la condición de CnoR recibieron más eyaculaciones ( $p=0.02$ ) y presentaron un intervalo inter-intromisión más corto ( $p=0.006$ ), en comparación con el grupo de hembras en CR (tabla 4). La receptividad se mantuvo cercana al 100% durante toda la prueba en ambas condiciones.

Se obtuvieron las frecuencias (# de eventos/ minuto) de diferentes conductas que ocurrieron durante la primera serie eyaculatoria (SE1), la segunda (SE2), la penúltima (PUSE) y la última (USE) en la condición de CnoRy CR (figura 14) y se compararon mediante un ANOVA de dos vías de medidas repetidas (MR). Para el caso del brincoteo/zig-zagueo, hubo una diferencia estadísticamente significativa para la condición  $F_{(1,59)}=21.976$ ,  $p<0.001$  y para la serie eyaculatoria (SE)  $F_{(3,59)}=8.246$ ,  $p>0.001$  (interacción  $F_{(3,59)}=1.433$ ,  $p=0.248$ ). En la figura 14 se muestran las frecuencias del orejeo, del zig-zagueo. Como se observa, hubo una disminución de la proceptividad a lo largo de la prueba de cópula continua durante 4 horas seguidas en ambas condiciones, siendo más notoria para el caso del orejeo en la condición de CnoR.

En la condición de CR, se analizó el tiempo de estancia de la hembra en el compartimento neutro y el número de cruces al compartimento del macho durante las 4 horas de prueba, mediante un ANOVA de Friedman de MR debido a que los datos no siguieron una distribución normal en ambos parámetros, y la prueba *post hoc* de Tukey. Las hembras permanecieron cada vez más tiempo en el compartimento neutro  $p=0.013$  y presentaron menos cruces,  $p<0.001$  al compartimento del macho (figura 15), de acuerdo con el ANOVA de Friedman-MR conforme se avanzaba la prueba.

Tabla 4. Parámetros conductuales en los grupos de cópula regulada y no regulada durante 4 horas. Diferente de CR \* $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; Prueba de U-Mann Whitney.

Parámetro	Condición	Mediana	Percentil (25%)	Percentil (75%)	p
Latencia de monta (seg)	CR	49	3	93	0.39
	CnoR	32	12.5	41	
Latencia de intromisión (seg)	CR	68	5	180	0.46
	CnoR	37	16	41	
# de montas	CR	17	7	43	0.5
	CnoR	22	14	34	
# de intromisiones	CR	33	23	35	0.12
	CnoR	38.5	31	41	
# de eyaculaciones	CR	7	6	8	0.02
	CnoR	8.5	8	11.5*	
Cociente de lordosis (%)	CR	100	97	100	0.5
	CnoR	100	100	100	
Intervalo interintromisión (seg)	CR	143	136	245	0.006
	CnoR	80	58	114**	

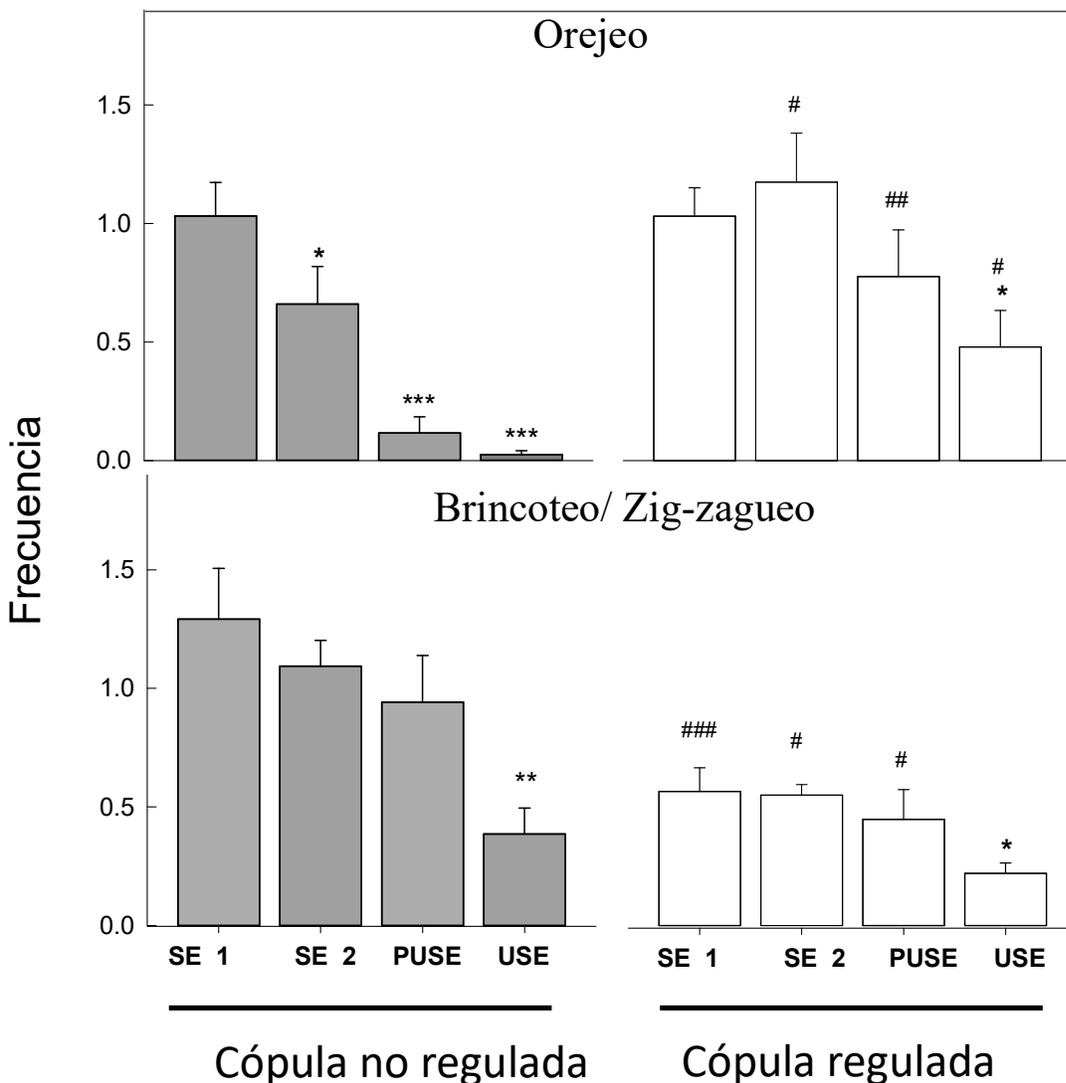


Figura 14. Conductas proceptivas en la rata hembra a lo largo de 4 h de cópula con un macho sexualmente experimentado. Cada barra representa una serie eyaculatoria. SE1= primer serie eyaculatoria; SE2=segunda serie eyaculatoria, PUSE= penúltima serie eyaculatoria; USE= última serie eyaculatoria. ANOVA de dos vías (serie eyaculatoria, condición). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs SE1; #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$  vs condición, análisis *post hoc* Tukey.

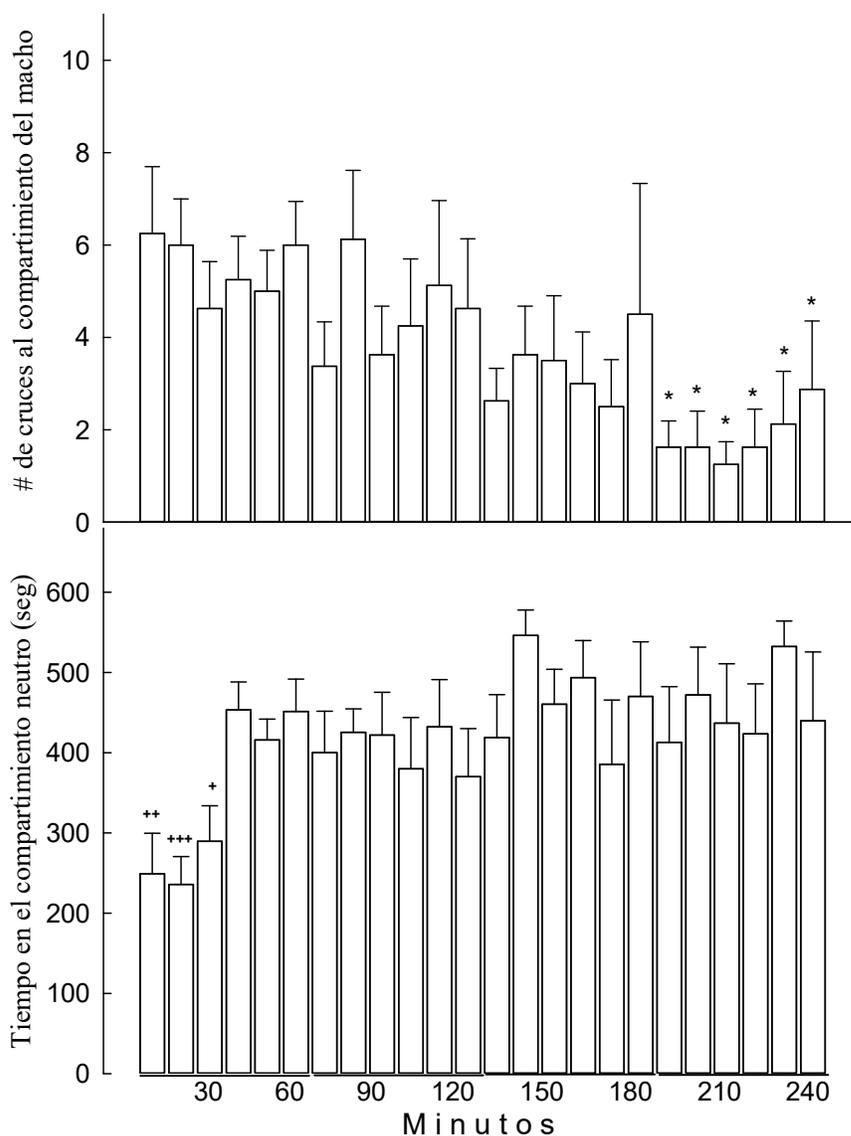


Figura15. Número de cruces de la hembra al compartimiento del macho (panel superior) y el tiempo de estancia en el compartimiento neutro (panel inferior) observados en la prueba de cópula regulada durante 4 horas. Cada barra representa un intervalo de 10 minutos, se muestran las medias  $\pm$  error estándar de la media (EEM). ANOVA de Friedman-MR  $*p < 0.05$  diferente de los primeros 40 minutos de prueba;  $+p < 0.05$ ;  $++p < 0.01$ ;  $+++p < 0.001$  diferentes de los del resto de intervalos de 10 min. Análisis *post hoc* Tukey.

## 6.2 Efecto Coolidge en hembras

En la tabla 5 se muestran los parámetros de la conducta sexual durante las pruebas de cópula de 1 hora de duración, bajo ambas condiciones experimentales. Se compararon los parámetros conductuales mediante un ANOVA de dos vías (condición, prueba). Sólo el número de

eyaculaciones recibidas durante las pruebas 2 y 3 difirió dentro del grupo de CnoR (*post hoc* Tukey  $p=0.03$ ), el número de intromisiones y eyaculaciones no difirieron a lo largo de las pruebas dentro de cada condición. La comparación entre condiciones de cópula mostró diferencias significativas en el número de montas, intromisiones y en el intervalo interintromisión.

Tabla 5. Conducta sexual observada en las 3 pruebas de 1 hora de cópula. Para fines demostrativos, se muestran las medianas y los percentiles para cada valor, así como las comparaciones hechas entre pruebas y entre condiciones mediante un ANOVA de dos vías (Condición, prueba). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las sesiones. Se marcan en negritas las diferencias encontradas entre condiciones.

	Prueba			Factor condición <sub>(1,80)</sub>	Factor prueba <sub>(2,80)</sub>	Condición x prueba <sub>(3,80)</sub>
	1 Mediana (Percentiles 25%-75%)	2 Mediana (Percentiles 5%-75%)	3 Mediana (Percentiles 25%-75%)			
<b># Montas</b>						
CR	15(6-29)	24 (18-35)	16 (13-32)	<b>F=7.33</b>	F=2.76	F=0.07
CnoR	34(17-49)	26 (16-38)	67 (37-87)	<b>P=0.01</b>	P=0.86	P=0.47
<b># Intromisiones</b>						
CR	28(22-35)	28 (24-33)	23 (18-28)	<b>F=7.35</b>	F=1.38	F=0.42
CnoR	45(27-60)	38 (35-60)	37 (31-44)	<b>P=0.01</b>	P=0.26	P=0.65
<b>#Eyaculaciones</b>						
CR	3(2-3)	3 (2-3)	3 (2-4)	F=1.20	F=3.71	F=0.5
CnoR	3(1-4)	4 (2-5)	3 (2-4)	P=0.28	P=0.03	P=0.60
<b>Cociente de lordosis</b>						
CR	100(99-100)	100 (98-100)	100 (99-100)	F= 0.04	F=0.62	F=2.29
CnoR	100(98-100)	100 (98-100)	100 (97-100)	P=0.83	P=0.53	P=0.11
<b>Intervalo interintromisión (seg)</b>						
CR	175(106-254)	108 (81-208)	102 (80-123)	F=41.81	F=0.38	F=1.16
CnoR	25(20-30)	27 (20-36)	34 (20-47)	<b>P&lt;0.001</b>	P=0.68	P=0.32

En la figura 16 se muestran los resultados del tiempo de estancia de las hembras en cada una de las zonas incentivadas tras las sesiones de cópula. Los datos se analizaron mediante una ANOVA MR de dos vías (condición, tipo de macho). Las hembras permanecieron más tiempo en la zona incentivada del MNOV (factor: macho  $F_{(1,55)}=50.713$ ,  $p<0.001$ ), que del

MCON, independientemente de la condición de cópula (factor: condición  $F_{(1,55)}=3.687$ ,  $p=0.06$ ; Interacción: macho x condición  $F_{(1,55)}=0.946$ ,  $p=0.34$ ). En la tercera prueba de MSI (figura 17), se compararon mediante un ANOVA de dos vías (condición, incentivo) el tiempo de estancia en las zonas incentivadas de un estímulo social (hembra) y sexual (MNOV y MCON). Se realizó el ANOVA MR correspondiente dependiendo de la combinación de incentivos, es decir, una para aquellas hembras a las cuales se les presentó el M CON y la hembra, y otra para aquellas hembras a las que se les presentó el M NOV y la hembra. Aquellas hembras a las que se les presentaron ambos incentivos novedosos, uno sexual (M NOV) y otro social (hembra sexualmente receptiva) no mostraron diferencias estadísticamente significativas que dependieran de la condición (factor: condición  $F_{(1,27)}=4.18$ ,  $p=0.052$ ) ni del tipo de incentivo (factor: incentivo  $F_{(1,27)}=1.57$ ,  $p=0.222$ ; interacción: condición x incentivo  $F_{(1,27)}=0.28$ ,  $p=0.60$ ); mientras que a aquellas hembras a las que se les presentó el M CON y la hembra, no mostraron diferencias dependiendo de la condición (factor: condición  $F_{(1,27)}=2.19$ ,  $p=0.152$ ), pero sí dependiendo del incentivo (factor: incentivo  $F_{(1,27)}=5.66$ ,  $p=0.026$ ; interacción: condición x incentivo  $F_{(1,27)}=2.68$ ,  $p=0.115$ ), ya que las hembras que regularon la cópula permanecieron más tiempo en cercanía de la hembra que del M CON (análisis *post hoc* Tukey,  $p=0.009$ ).

En la prueba de PP (figura 18), de acuerdo al ANOVA MR de dos vías (condición, incentivo) las hembras permanecieron más tiempo en el compartimento del M NOV (factor: incentivo  $F_{(1,55)}=10.09$ ,  $p=0.004$ ), independientemente de la condición de cópula (factor condición  $F_{(1,55)}=1.49$ ,  $p=0.23$ ; interacción: condición x incentivo  $F_{(1,55)}=0.159$ ,  $p=0.69$ ), las hembras prefieren estar en el compartimento con el MNOV, pero reciben la misma cantidad de conducta sexual de ambos machos (tabla 6).

### Motivación sexual incentiva

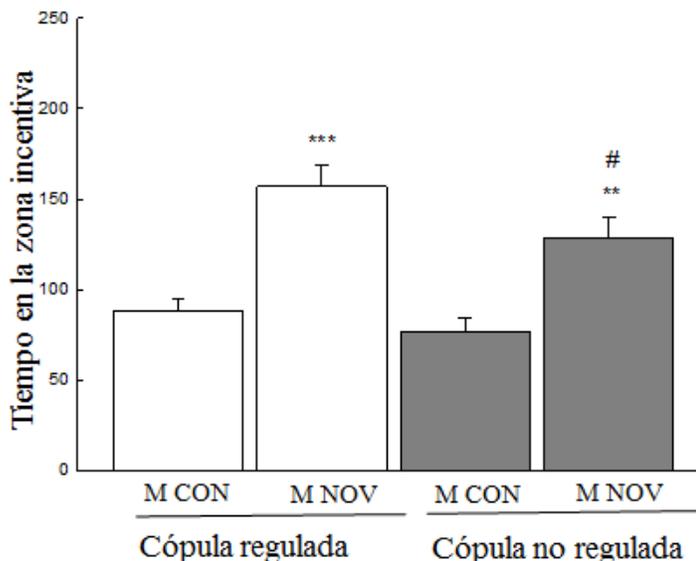


Figura 16. Tiempo de permanencia de la hembra en la zona incentiva durante la prueba de motivación sexual incentiva. RM ANOVA de dos vías (macho, condición de cópula) \*\*Diferente de M CON en la misma condición de copula  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . # Diferente de M NOV de cópula regulada. M CON: macho conocido, M NOV: macho novedoso, análisis *post hoc* Tukey.

### Motivación sexual incentiva

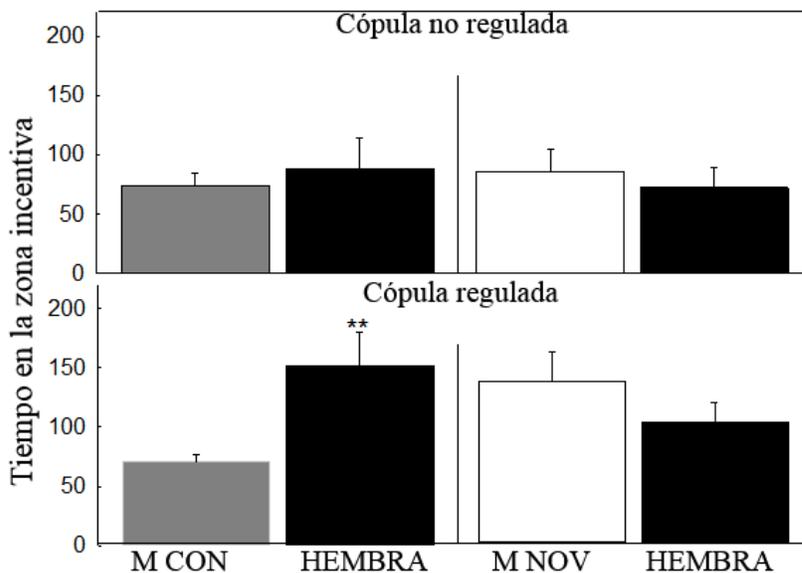


Figura 17. Tiempo de permanencia de la hembra en la tercera prueba de motivación sexual incentiva. ANOVA de dos vías (incentivo, condición). \*\* $p < 0.01$ , diferente de M CON en la misma condición de cópula. M CON: macho conocido, M NOV: macho novedoso. Análisis *post hoc* Tukey

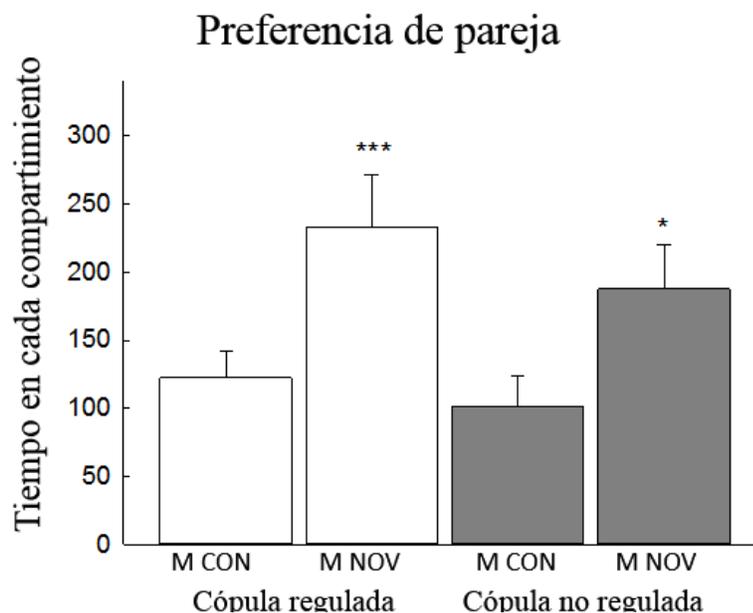


Figura 18. Tiempo de permanencia de la hembra en cada compartimento, durante la prueba de preferencia de pareja. ANOVA de dos vías (condición, macho)

\*Diferente del M CON en la misma condición de cópula  $p > 0.05$ , \*\*\* $p > 0.001$ .

Tabla 6. Conducta sexual durante la prueba de preferencia de pareja. M CON: macho conocido, M NOV: macho novedoso. Prueba U de Mann Whitney.

Parámetro	Cópula Regulada			Cópula no regulada		
	Mediana (percentil 25%-75%)	Mediana (percentil 25%-75%)	P	Mediana (percentil 25%-75%)	Mediana (percentil 25%-75%)	P
	<b>M CON</b>	<b>M NOV</b>		<b>M CON</b>	<b>M NOV</b>	
# Montas	0 (0-3)	0 (0-3)	0.62	2 (0-4)	1 (0-2)	0.47
# Intromisiones	3 (0-5)	4 (2-5)	0.41	1 (0-4)	1 (0-5)	0.82
# eyaculaciones	0 (0-1)	0 (0-1)	1	0 (0-1)	1 (0-1)	0.69

### 6.3 Cópula y expresión génica de receptores a opioides

En la tabla 7 se muestra la conducta sexual expresada durante la sesión de 1 h de cópula de aquellos grupos experimentales a los cuales se les extrajo el cerebro a las 4, 12 y 24 horas posteriores a la prueba. Se compararon los datos mediante un ANOVA de dos vías (condición, horario), la cual no arrojó diferencias entre horarios. Sí encontramos diferencias entre las condiciones de cópula, siendo mayor el número de intromisiones y eyaculaciones; así como un intervalo inter-intromisión más corto en el caso de la CnoR.

En la figura 19 se muestran los niveles del ARNm del gen que codifica para el receptor opioide  $\mu$  a las 4, 12 y 24 horas después de la sesión de cópula. Cada barra representa la media  $\pm$ EEM por grupo. Los datos fueron normalizados respecto al grupo control y se expresan en unidades relativas con respecto a éste. El análisis estadístico se hizo mediante un ANOVA de Kruskal-Wallis por cada horario, debido a que no todos los datos mostraron una distribución normal. Como se observa en la tabla 8 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos estudiados.

Tabla 7. Conducta sexual en condición de cópula regulada y no regulada, en animales sacrificados a las 4, 12 y 24hr después de la sesión de conducta. ANOVA de dos vías (horario, condición), análisis *post hoc* Tukey. #M: número de montas. #I: número de intromisiones, #E: número de eyaculaciones, III: intervalo interintromisión.

	Horario (horas)	Mediana (percentil 25%-75%) CR	Mediana (percentil 25%-75%) CnoR	Factor: horario (2,36)	Factor: condición (1,36)	Horario x Condición (2,36)
#M	4 12 24	10 (11—54) 25 (14-28) 22 (13-27)	17 (6-24) 18 (10-38) 14 (4-25)	F=0.52, p=0.59	F=1.84 p=0.18	F=0.87 p=0.59
#I	4 12 24	17 (13-27) 18 (17-23) 17 (11-24)	30 (17-32) 29 (27-32) 28 (21-35)	F=0.41 p=0.66	F=19.60 p<0.001	F=0.22 p=0.80
#E	4 12 24	3 (2-3) 2 (2-3) 3 (2-3)	3 (2-4) 4 (3-5) 3 (3-4)	F=0.67 p=0.51	F=7.84 p=0.009	F=0.68 p=0.51
III	4 12 24	119 (78-209) 108 (67-141) 100 (70-143)	45 (33-131) 54 (41-58) 56 (51-101)	F=1.04 p=0.36	F=6.50 p=0.016	F=0.35 p=0.70

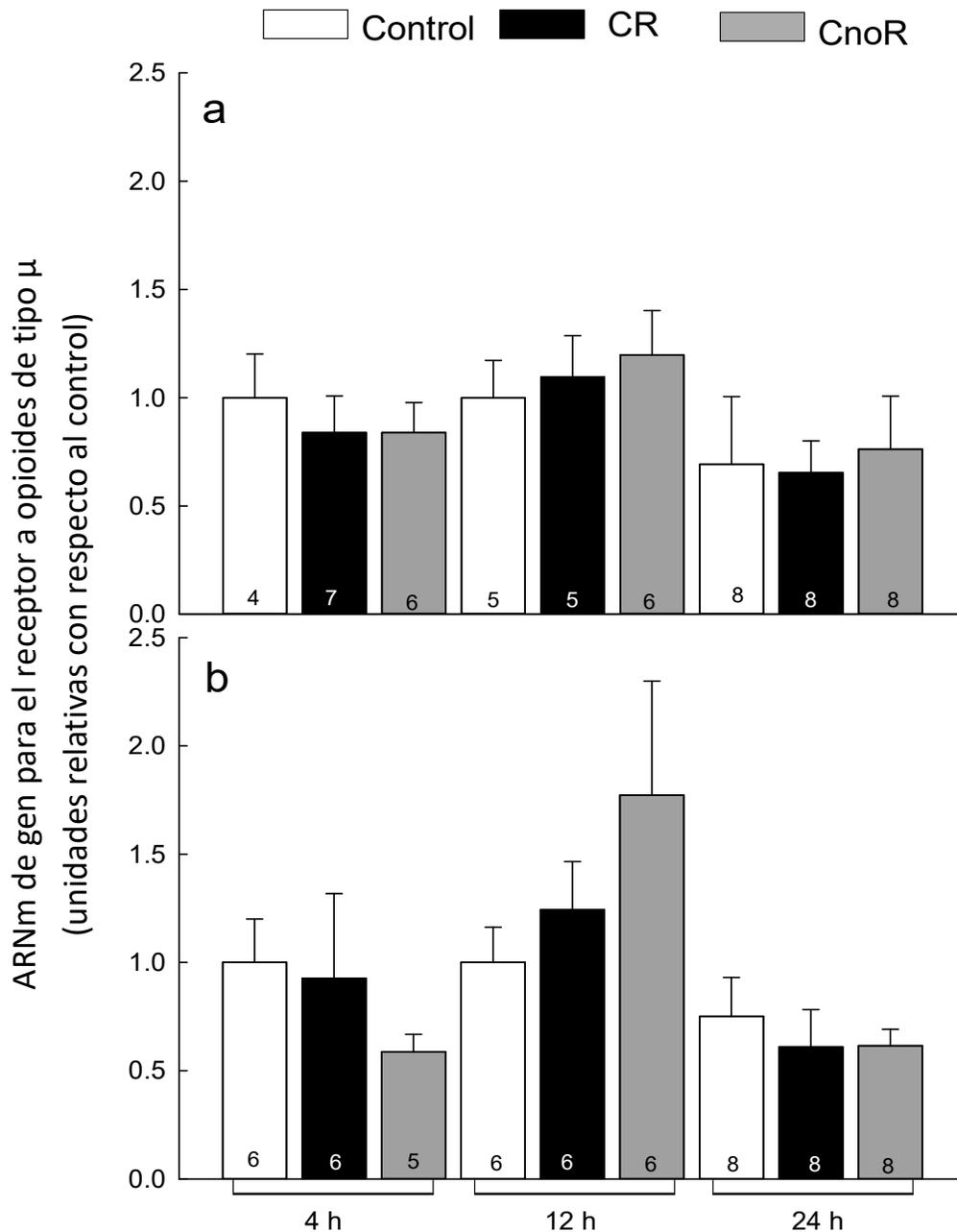


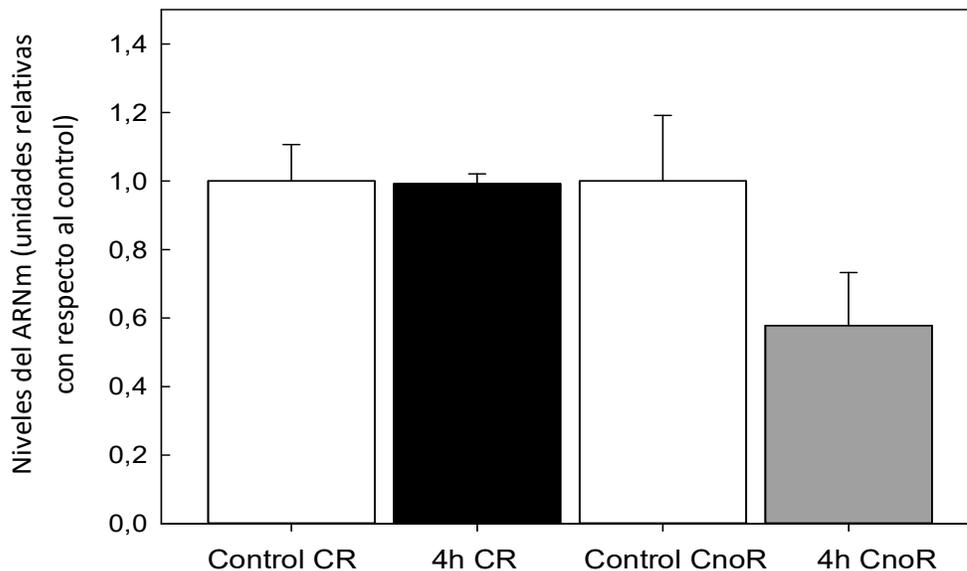
Figura 19. Niveles del ARNm del gen que codifica para el receptor opioide  $\mu$  en el área preóptica medial (APOm) e hipotálamo ventromedial (HVM) tras una sesión de cópula (regulada, CR; no regulada, CnoR). ANOVA de una vía. Dentro de cada barra se muestra el número de sujetos final por grupo.

Tabla 8. Análisis estadístico de la expresión del gen que codifica para el receptor opioide  $\mu$  en el área preóptica media (APOm) e hipotálamo ventromedial (HVM) a las 4, 12 y 24 horas posteriores a la prueba de 1 hora de cópula. Se muestran las medianas (percentil 25%-75%). ANOVA de Kruskal-Wallis; CR, cópula regulada; CnoR, cópula no regulada.

APOm			p	Horario	HVM			p
Control	CR	CnoR			Control	CR	CnoR	
1.03 (0.59- 1.36)	0.98 (0.30- 1.18)	0.95 (0.95- 0.52)	0.79	4 horas	0.94 (0.55- 1.38)	0.50 (0.31- 1.55)	0.67 (0.39- 0.73)	0.31
1.00 (0.64- 1.34)	1.37 (0.63- 1.41)	1.25 (0.71- 1.56)	0.79	12 horas	0.96 (0.70- 1.25)	1.36 (0.73- 1.66)	1.2 (0.83- 3.11)	0.44
0.8 (0.61- 1.15)	0.70 (0.11- 1.15)	0.71 (0.09- 1.17)	0.85	24 horas	0.63 (0.36- 1.07)	0.43 (0.36- 0.65)	0.62 (0.44- 0.80)	0.53

Inicialmente elegimos el grupo de 4 horas de CnoR para estudiar la expresión del gen que codifica para el receptor  $\mu$  en el APOm, debido a que los cambios en la proceptividad fueron mayores bajo esta condición. Como se observa en la figura 20, la expresión del gen que codifica para el receptor opioide  $\mu$  en el APOm no se modifica tras 4 horas de CnoR. Posteriormente se decidió incluir el grupo de CR. Debido a que la técnica de q-PCR es altamente sensible, se recomienda realizar todas las condiciones experimentales al mismo tiempo de tal manera que los resultados puedan ser comparables, por lo que el grupo de CR se estudió a la par con su respectivo grupo control. Posteriormente se compararon los dos grupos control con la finalidad de unirlos en uno solo para ambas condiciones antes de la normalización de datos. Mediante una prueba T ( $t=-3.65$ , 11 grados de libertad;  $p=0.014$ ) se demostró que estos no se comportaron de manera similar, por lo que decidimos mantener a cada grupo de cópula con su respectivo grupo control y así mostrarlos de forma independiente en la figura 20.

Figura 20. Niveles del ARNm del gen que codifica para el receptor a opioides tipo  $\mu$  en el APOm tras 4 h de cópula regulada y no regulada. Prueba T comparando cada condición de cópula con su grupo control ( $p=0.93$  para CR y  $p=0.10$  para CnoR),  $n=8$  por grupo.



Por último, la conducta sexual desplegada en el grupo de cópula repetida se analizó mediante un ANOVA de Friedman entre las sesiones dentro de cada condición, y mediante una prueba de U Mann Whitney para comparar entre condiciones debido a que los datos no tuvieron una distribución normal. Como se observa en la tabla 9, no hubo diferencias en la conducta sexual a lo largo de las cuatro sesiones, dentro de cada condición. Mientras que la comparación entre condiciones arrojó que las hembras que no regulan la cópula presentaron una latencia de monta más corto, así como un número de montas y de intromisiones mayores; y un intervalo interintromisión menor, en comparación a aquellas hembras que regularon la cópula. La expresión de los genes para receptores  $\mu$ ,  $\kappa$  o  $\delta$  en el APOm, HVM o AMG (figura 21) de las hembras que tuvieron sesiones de cópula repetida se muestra en la figura 21. Los datos se compararon mediante un ANOVA de Kruskal Wallis (KW) independiente para cada uno de los genes, en un área cerebral en específico (véase tabla 9).

Tabla 9. Conducta sexual ocurrida en las cuatro sesiones de cópula. LM: latencia de monta, LI: latencia de intromisión, #M: número de montas, #I: número de intromisiones, #E: número de eyaculaciones, III: intervalo interintromisión, CR: cópula regulada, CnoR: cópula no regulada. \*\* $p < 0.01$ , diferente de CR, U Mann Whitney.

Parámetro	Sesión	25%	Mediana	75%	<i>P</i> vs sesión	<i>P</i> vs condición	
LM (seg) CnoR	1	27.25	52.5	74	0.21	0.002	
	2	24.75	33	40.75			
	3	40.25	70.5	146.75			
	4	34.25	68	117			
	CR	1	29	161	213.5		<b>0.86**</b>
		2	70.25	192	450		
		3	56.75	114	193.5		
		4	46.25	92	127		
LI (seg) CnoR	1	33.75	83	204.5	0.34	0.159	
	2	66.75	157.5	185.75			
	3	74.5	151.5	203.75			
	4	78	118.5	204			
	CR	1	93	201.5	435		0.29
		2	107.25	332.5	545		
		3	64.5	152.5	354		
		4	46.25	92	189.75		
# M	CnoR	1	16.5	29.5	37.75	0.069	0.008
		2	23	32.5	59.25		
		3	18.75	33	49		
		4	12.75	16.5	28		
	CR	1	17	26	36.5	<b>0.358**</b>	
		2	11.5	15.5	27.75		
		3	5	17	32.75		
		4	11.25	14	19.75		
# I	CnoR	1	15.25	265	34	0.167	0.005
		2	22	27	35.75		
		3	22.75	27	31.5		
		4	18.75	22.5	28		
	CR	1	12.25	16.5	31.75	<b>0.416**</b>	
		2	12	16	25.75		
		3	19.25	22	25.25		
		4	18.25	22	26.25		
# E	CnoR	1	1.25	2.5	3	0.649	0.7
		2	1	1	3		
		3	1	2	2.75		
		4	1.25	2	2		
	CR	1	1	1.5	2.75	0.309	
		2	1	2	2		
		3	2	2	3		
		4	2	2	3		
III (seg) CnoR	1	56.68	79.3	165.73	0.832	0.045	
	2	53.29	86.41	125.82			
	3	58.68	83.33	106.6			
	4	56.84	83.04	153.75			
	CR	1	76.09	167	217.95		<b>0.583*</b>
		2	93.83	120.22	185		
		3	63.37	86.53	128.96		
		4	78.69	105.68	122.83		

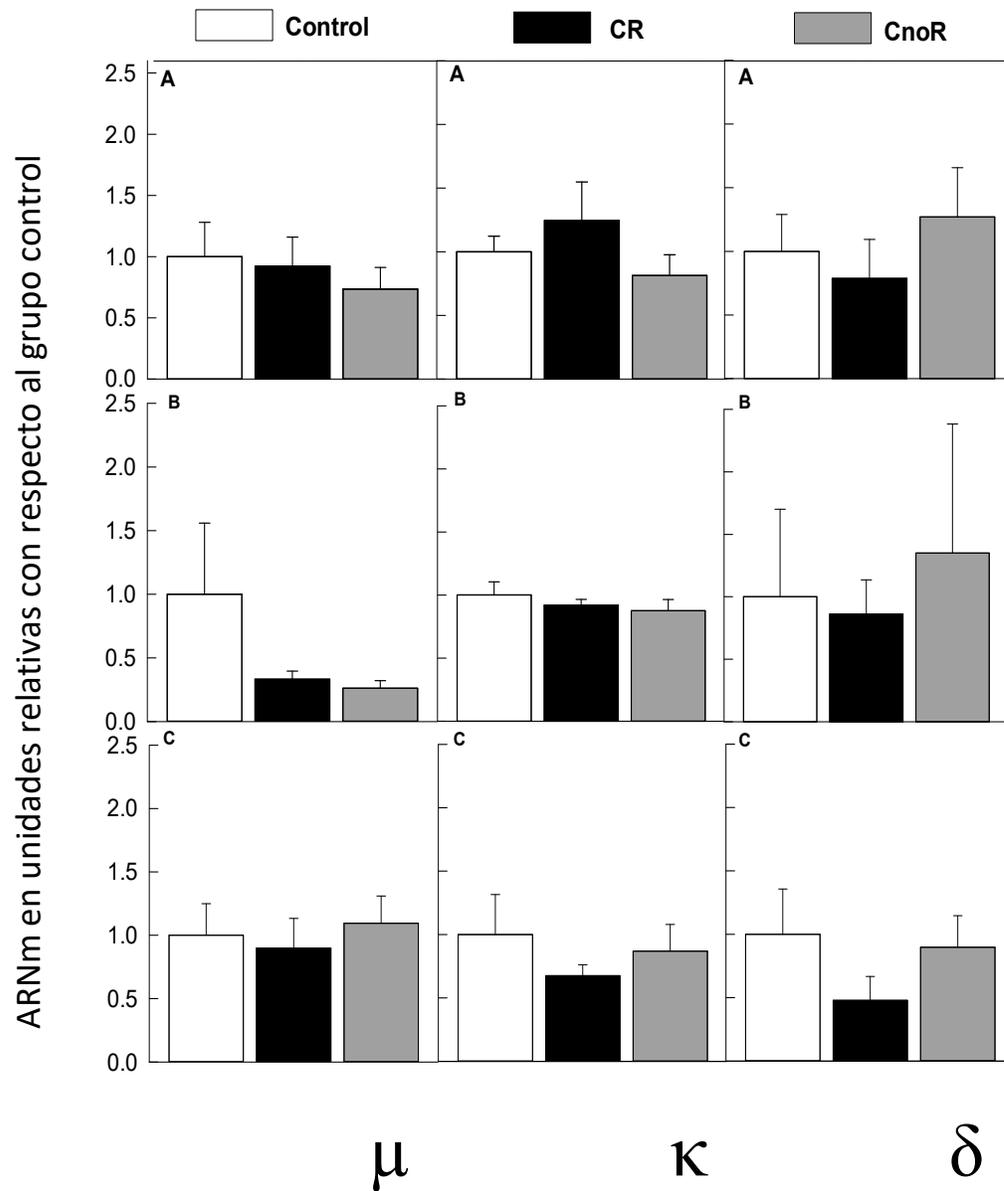


Figura 21. Niveles del ARNm de los genes que codifican para los receptores a opioides tipo  $\mu$ ,  $\kappa$  y  $\delta$ , tras 4 sesiones de cópula, regulada o no por la hembra en panel A) área preóptica medial, B) hipotálamo ventromedial y C) Amígdala. Análisis de Kruskal Wallis por cada gen y región cerebral n=8 por grupo. Se muestra la media  $\pm$  EEM.

Tabla 10. Análisis estadístico de la expresión de los genes  $\mu$ ,  $\kappa$  y  $\delta$  en el APOM, HVM y AMG tras la cópula repetida. Análisis de Kruskal Wallis para cada gen y área.

Gen	Control	CR	CnoR	H	p
APOM					
$\mu$	1.12 (0.15-1.71)	0.93 (0.28-1.16)	0.78 (0.26-1.10)	0.285	0.86
$\kappa$	1.00 (0.62-1.30)	1.04 (0.73-1.36)	0.77 (0.37-1.27)	1.145	0.56
$\delta$	0.71 (0.34-1.71)	0.53 (0.27-0.79)	1.13 (0.15-2.41)	0.335	0.84
HVM					
$\mu$	0.23 (0.19-1.65)	0.35 (0.17-0.49)	0.18 (0.15-0.34)	1.715	0.42
$\kappa$	0.96 (0.82-1.20)	0.94 (0.83-1.00)	0.82 (0.75-0.85)	2.66	0.26
$\delta$	0.283 (0.13-0.62)	0.56 (0.24-1.64)	0.13 (0.07-1.30)	3.125	0.21
AMG					
$\mu$	1.07 (0.23-1.69)	0.79 (0.33-1.58)	1.14 (0.54-1.65)	0.287	0.86
$\kappa$	0.73 (0.35-1.45)	0.77 (0.42-0.88)	0.60 (0.43-1.33)	0.185	0.91
$\delta$	0.49 (0.24-2.08)	0.32 (0.05-0.97)	0.62 (0.40-1.14)	2.445	0.29

## VII. Discusión

### 7.1 Saciedad sexual

La saciedad sexual se relaciona con la inhibición de la conducta sexual a largo plazo, que se recupera tras dos a tres semanas (Fernández-Guasti & Rodríguez-Manzo, 2003; Phillips-Farfán & Fernández-Guasti, 2009; Rodríguez-Manzo *et al.*, 2011); y con cambios neurobiológicos, como por ejemplo, la disminución de la expresión de los receptores a andrógenos en el NA, el NPM y el HVM (Phillips-Farfán & Fernández-Guasti, 2007). Como se ha mencionado, la saciedad sexual en hembras ha sido poco explorada y son contados los intentos para establecer los criterios conductuales que permitan su definición análoga en machos. Por ejemplo, en hámsteres se consideró que las hembras estaban sexualmente saciadas cuando, tras copular libremente con un macho, dejaban de presentar la posición de lordosis a pesar de recibir montas (Lisk & Baron, 1982; Lester & Gorzalka, 1988). En ratas hembras que copularon en condiciones de CR, se consideró que presentaban saciedad sexual después de un periodo de 20 minutos en los que la hembra no pasaba al compartimento del macho (Ágmo, 2007a). Recientemente se encontró que la rata hembra presenta la disminución en la frecuencia de aparición de las conductas proceptivas a lo largo de 180 minutos la cópula continua y que su inhibición podría ser un indicador de la saciedad sexual en hembras (Ventura-Aquino & Fernández-Guasti, 2013). En el presente trabajo, extendimos el tiempo de prueba a 360 minutos, este periodo de acuerdo a lo sucedido en machos (*vide supra*) y con la finalidad de determinar si se lograba la extinción de la proceptividad, encontrando la disminución importante de la proceptividad (figura 14) durante la cópula continua por 4 horas, en ambos grupos experimentales (CR y CnoR) y la disminución de las interacciones de la hembra con el macho en el grupo de CR (figura 15); mientras que la receptividad no sufrió modificaciones. No obstante, bajo este paradigma de 4 horas de cópula, la conducta sexual del macho también se ve disminuida conforme éste se acerca a la saciedad sexual. Al respecto, existe un estudio clásico hecho por Monica Krieger y

colaboradores en 1976, en el cual se observó la conducta sexual en hembras (en proestro natural e inducido por hormonas exógenas) en un paradigma en donde el macho se encontraba en una caja de cópula, sujeto por un arnés y por ende, estaba confinado a un área de la arena (Krieger *et al.*, 1976). Las conductas consideradas fueron aquellas que ocurrieron en las primeras tres series eyaculatorias. Bajo estas condiciones, reportaron una disminución de la conducta sexual de la hembra, medida como una disminución en los niveles de proceptividad y del número de visitas de la hembra a un área virtualmente delimitada en donde se encontraba el macho. Sin embargo, ellos propusieron que las respuestas copulatorias de la hembra, estaban estrechamente relacionadas con la conducta del macho, especialmente durante los periodos refractarios ocurridos tras una eyaculación, en los cuales, había también una inhibición mayor de la conducta sexual de la hembra. De hecho, hay evidencia de que durante los periodos posteyaculatorios, los machos emiten ultravocalizaciones de 22 kHz que ahuyentan a la hembra e inhiben su conducta sexual (Fernández-Guasti *et al.*, 1986). Krieger y colaboradores concluyeron que la secuencia de los eventos copulatorios es el resultado de la interacción del comportamiento sexual entre ambos sexos. En apoyo a esta hipótesis, en un estudio reciente hecho por el grupo de Anders Ågmo en un ambiente seminatural, en donde se alojaron 4 hembras y 3 machos. Al analizar la conducta sexual, encontraron que los contactos sexuales se daban como consecuencia de la iniciativa de ambos sexos y que hay una interacción constante entre los machos y hembras (Bergheim *et al.*, 2015).

Una de las intenciones del presente trabajo al extender la sesión de cópula a 4 horas era observar la extinción de la proceptividad. Sin embargo, a pesar de que estas conductas disminuyeron considerablemente, no se observó su inhibición completa. La proceptividad disminuye conforme la cópula continúa, posiblemente como una manifestación de la disminución de la motivación sexual, mientras que la lordosis se mantuvo en niveles óptimos a lo largo de toda la prueba. De hecho, la receptividad sexual, una conducta

dependiente de las hormonas sexuales, no mostró modificaciones a lo largo de la prueba, lo que pone en evidencia que las modificaciones en la proceptividad no son debidas a que el periodo de receptividad sexual haya terminado. Sin embargo, no se descarta que la proceptividad se presente, aun en niveles mínimos, mientras dure el periodo de receptividad sexual (Blaustein & Erskine, 2002).

En términos conductuales, es claro que la cópula provoca la disminución pausada y paulatina en la conducta sexual femenina, pero no al punto de su extinción mientras dure el periodo de receptividad sexual, un hecho que sería el análogo a la saciedad sexual masculina. Lo anterior, en términos biológicos podría tener como consecuencia para hembras cuyos periodos reproductivos son limitados y breves, como las ratas, la conducta sexual se mantenga activa a lo largo de todo el tiempo que los niveles hormonales sean los adecuados, y con ello se aumente la posibilidad del éxito reproductivo. Sin embargo, es claro que la motivación sexual en las hembras disminuye por la cópula, por lo que deberán hacerse más aproximaciones experimentales para entender los mecanismos involucrados.

### **7.2 Efecto Coolidge en hembras**

En ambas condiciones de cópula, las hembras mostraron una mayor motivación sexual incentiva por el MNOV, que por el MCON, siendo más notorio este aumento en aquellas que regularon la cópula (figura16). Para determinar si esta preferencia se debía a la novedad por sí misma, en la segunda prueba de MSI, ambos incentivos fueron novedosos pero uno fue social (hembra sexualmente receptiva) y el otro fue sexual, ya sea novedoso (MNOV) o conocido (MCON). En esta situación, sólo aquellas hembras que regularon la cópula permanecieron más tiempo en cercanía del incentivo social, que del sexual (MCON) (figura 17), denotando que el valor incentivo del MCON disminuyó por debajo del valor del incentivo social, el cual era además novedoso para la hembra. Considerando que, durante la cópula, interaccionan estímulos de índole positivos y negativos, es posible que durante la CnoR, esta relación se torne hacia el lado negativo; mientras que

en la CR sucede lo contrario. Lo anterior se apoya en las observaciones hechas por Nyuyki y colaboradores, en hembras que copularon bajo CR y CnoR tras lo cual, evaluaron su comportamiento en la prueba de laberinto elevado (Nyuyki *et al.*, 2011). Los resultados mostraron que la sola inducción hormonal produjo un efecto ansiolítico, evaluado como un mayor tiempo de estancia en los brazos abiertos, así como un aumento en el número de entradas a éstos. Este efecto se mantuvo sólo en las hembras que regularon la cópula; mientras que en aquellas bajo CnoR, la cópula indujo un efecto ansiogénico (Nyuyki *et al.*, 2011). Considerando que animales bajo un efecto ansiolítico tienen mayor conducta de exploración, es posible que el efecto ansiolítico de la CR facilitara que las hembras interactuaran mayormente con el incentivo social que con el macho conocido. Por otro lado, cuando ambos incentivos fueron novedosos, las hembras mostraron acercamiento hacia ambos por igual. Sin embargo, en el grupo de CR se observó una mayor permanencia de la hembra en ambas zonas incentivas, lo que también pudiera deberse a que después de la CR, las hembras presentan menos ansiedad y por ello, interactúan más con ambos incentivos, a pesar de no preferir a ninguno de ellos.

Durante la prueba de PP, las hembras mostraron preferencia por el M NOV, ya que pasaron más tiempo en el compartimento con el M NOV (figura 5) sin embargo, copularon igualmente con ambos machos (tabla 3). Es posible que una hora de cópula no induzca la habituación suficiente al M CON y por ende, la presentación del M NOV no produzca la deshabituación marcada. La elección de pareja por las hembras se ha estudiado en otros paradigmas; por ejemplo, en la arena de elección múltiple en la que la hembra puede elegir entre 4 machos diferentes (Ferreira-Nuño *et al.*, 2005). En este paradigma, las hembras generalmente pasan más tiempo y copulan mayormente con uno de los machos, aunque interactúan sexualmente con todos. En un ambiente seminatural donde las hembras intactas en proestro podían copular con tres machos diferentes. Éstas mostraron preferencia por uno de ellos, con el cual presentaron más respuestas de lordosis y del cual

recibieron mayor número de intromisiones y de eyaculaciones. Sin embargo, también recibieron intromisiones y eyaculaciones de todos los machos, durante 7 horas de observación (Chu & Agmo, 2014).

En el presente trabajo, en la prueba de PP, el hecho de que las hembras copularan indiscriminadamente durante los 15 minutos que dura esta prueba puede deberse precisamente a la duración de la misma. Es posible que cambios mayores en la conducta sexual pudieron verse velados por la duración de la prueba ya que, como muestra la tabla 6, la conducta sexual ejecutada fue limitada (de acuerdo con los percentiles 25% y 75%), a pesar de que las hembras sí pasaron más tiempo en el compartimento del M NOV. Por otro lado, en la prueba de PP no se tomaron en consideración otros indicadores de motivación como las conductas proceptivas o el número de visitas que las hembras experimentales hicieron a cada uno de los machos (Ágmo, 2007a; Ventura-Aquino & Fernández-Guasti, 2013). Sin embargo, a pesar de estas limitaciones, que requieren de futuras exploraciones, los resultados del presente trabajo se suman a la evidencia que indica que la novedad sexual induce cambios conductuales que pueden considerarse como la expresión del efecto *Coolidge* en hembras. Siendo posible que la expresión de este efecto sea propia para cada sexo. De hecho, se considera que el patrón de la habituación a un mismo estímulo sexual es diferente entre los sexos. Un claro ejemplo de ello es la vasocongestión genital, evaluada por pletismografía, en mujeres y hombres. Cuando se les presentó un mismo estímulo visual sexualmente explícito de manera repetida, se demostró que mientras la respuesta en los varones se redujo escalonadamente conforme se repetía la presentación del estímulo, en las mujeres se mantenía constante a lo largo de la prueba. Estos datos sugieren que en las mujeres, la habituación a un mismo estímulo de índole sexual es más resistente que la habituación masculina (Suschinsky & Lalumière, 2011; Dawson *et al.*, 2013). Tomando en cuenta lo anterior es posible que también los patrones de habituación sean diferentes entre los sexos en otras especies, y que ésta sea la responsable del porqué en

hembras, el establecer los criterios (bien definidos en machos) de saciedad sexual y de efecto *Coolidge* sean difíciles de implementar. No obstante, este campo es de reciente surgimiento en el área de la investigación preclínica. De hecho, la noción de que los patrones de habituación a un mismo estímulo sexual son diferentes entre los sexos no ha sido explorada en otras especies, así como tampoco los mediadores que pudieran estar involucrados.

### **7.3 Cópula y expresión genética de receptores a opioides**

A partir de los estudios de secuenciación del ADN genómico de los 3 genes codificantes para los receptores opioides  $\mu$ ,  $\kappa$  y  $\delta$ , sabemos que éstos comparten una homología del 73-100% en la secuencia de los exones codificantes, los cuales se encuentran en el centro de cada gen (Wei & Loh, 2002; 2011). Estos exones codifican para los siete dominios transmembranales, lo que sugiere que estos genes evolucionaron de un gen ancestral común. Sin embargo, las secuencias de estos genes difieren notablemente (9-20% de homología) en los extremos amino y carboxilo terminales (Wei & Loh, 2011). Esta divergencia es responsable de las actividades diferenciales y de la especificidad de los ligandos para cada subtipo de receptor. Asimismo, se ha establecido que a pesar de estas similitudes estructurales, cada uno de los genes para los receptores a opioides es sujeto a mecanismos reguladores independientes y se expresan de manera diferencial (Wei & Loh, 2002; Wei *et al.*, 2004; Wei & Loh, 2011).

En el presente trabajo no encontramos modificaciones en la expresión de los genes que codifican para los receptores a opioides en ninguno de nuestros grupos experimentales evaluados. Como se explicará, existen diversos estudios que han evaluado la expresión genética de estos receptores usando varias técnicas y en diversos tejidos. Los resultados que se han encontrado denotan que la regulación de la expresión genética se controla finamente a diversos niveles, lo que podría explicar nuestros resultados. A continuación, se explicarán los mecanismos reguladores de los genes que codifican para los receptores a opioides, así como los resultados

obtenidos bajos diversas estrategias experimentales que ayuden a comprender los resultados obtenidos en el presente trabajo.

### **7.3.1 Regulación transcripcional de los genes que codifican para los receptores a opioides**

Los estudios sobre la modulación a nivel transcripcional de los genes que codifican para los receptores a opioides se han realizado principalmente en ratones y en cultivos de células humanas. Los tres genes comparten las secuencias consenso a las que se unen factores de transcripción que favorecen la expresión tales como el factor nuclear  $\kappa\beta$  (FN $\kappa\beta$ ), la familia de proteínas específicas (SP; por sus siglas en inglés), la familia de las proteínas activadoras, (AP1) e Íkaros (IK), todos ellos se caracterizan por carecer de la secuencia o caja TATA (timidina-adenina-timidina-adenina) (Wei & Loh, 2002), lo que indica que los mecanismos que regulan la transcripción son compartidos entre estos genes. Sin embargo, no se ha descrito que un factor de transcripción participe de manera determinante en algún tipo celular, ni bajo alguna condición dada. Por lo tanto, se cree que la regulación basal en común que comparten estos genes determina la sobreposición de la expresión de los tres receptores en ciertas poblaciones celulares, incluyendo las neuronas; mientras que los patrones específicos para cada gen puede estar determinados por la interacción entre señales tales como factores de crecimiento, citosinas presentes en los diferentes tipos celulares. Lo anterior está sustentado en las observaciones hechas en cultivos de células de carcinoma embrionario P19 así como en tejidos embrionarios en los que se observa un patrón temporal específico en la expresión de cada uno de estos genes a lo largo del desarrollo (Zhu *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1999).

La regulación de la expresión de los genes para los receptores a opioides también puede darse mediante factores epigenéticos, es decir, aquellos que no están determinados por la secuencia genética. Esta regulación puede llevarse a cabo a través de modificaciones en la cromatina hasta estructuras de mayor orden, tales como la arquitectura nuclear; no

obstante, las primeras han sido las más estudiadas. Entre éstas encontramos principalmente a la metilación del ADN, a las modificaciones en las uniones covalentes de las proteínas e histonas tales como la acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación y ribosilación, entre otras (Wei & Loh, 2011). Entre los ejemplos del papel de la epigenética en la regulación de los genes que codifican para los receptores a opioides podemos mencionar que, para el gen del receptor  $\mu$ , el promotor se encuentra extensamente metilado en cultivos indiferenciados de células P19, silenciando su expresión. Por otro lado, se ha encontrado que el ADN está metilado en el *locus* del gen de este receptor en sujetos adictos a la heroína (Wei & Loh, 2011); demostrando que la regulación de este gen involucra también mecanismos epigenéticos. En el caso de gen del receptor  $\delta$ , se ha observado una metilación intensa en su promotor en células que no expresan el receptor  $\delta$ , como es el caso de la línea celular de neuroblastoma Neuro2A (Wang & Loh, 2003; Wei & Loh, 2011). Se ha observado que las modificaciones en la cromatina también modifican la actividad del gen para el receptor  $\kappa$  (Wei & Loh, 2011).

La modulación funcional de los receptores a opioides no sólo involucra la modulación en la transcripción, sino también cambios postranscripcionales tales como el empalme (*splicing*) alternativo. En relación a éste, la mayoría de las variantes de ARNm que se han descrito para los receptores a opioides, codifican para la misma secuencia de aminoácidos, a excepción de 5 isoformas de ARNm para el receptor  $\mu$ . Sin embargo, no se han encontrado diferencias funcionales entre estas variantes (Wei & Loh, 2002), y se ha propuesto que puede haber participación a través de la formación de heterodímeros de las unidades de los receptores (Wei & Loh, 2011). La traducción de una misma proteína a partir de diferentes ARNm se ha relacionado con el control de su expresión dependiendo del tipo celular y se ha encontrado también en otros genes tales como el que codifica para el receptor B del ácido Gama-Amino Butírico (GABA<sub>B</sub>) (Wei & Loh, 2002).

A nivel de los receptores a opioides se ha mostrado que las consecuencias en la transducción de señales dependerá de la cantidad de receptores y de las moléculas efectoras << río abajo >> que se encuentren disponibles (Law & Loh, 1999; Wei & Loh, 2011). Asimismo, se ha visto que el sistema de transducción de los receptores a opioides puede regularse por medio del andamiaje. Este proceso consiste en el agrupamiento de los mediadores de una cascada de señalización en un área específica de la célula, que favorece la eficiencia o especificidad de una vía de señalización (Hall & Lefkowitz, 2002; Wei *et al.*, 2004). De esta manera, receptores que están acoplados a una misma proteína G, pueden producir diferentes respuestas debido al andamiaje que organiza a los mediadores, de tal forma que se dé un tipo particular de respuesta.

Algunos de estos mecanismos se han observado con los efectos de la cópula sobre la regulación del sistema opioide en machos. En aquellos que presentan una eyaculación, se induce la activación y posterior internalización del receptor opioide  $\mu$  en el APOm, eventos que se previenen con la administración sistémica de naloxona. También se ha observado la endocitosis del receptor a opioide de tipo  $\mu$  en el ATV, la cual es proporcional a la actividad copulatoria; siendo mayor en machos sexualmente saciados, en comparación con aquellos que eyacularon una vez (Garduño-Gutiérrez *et al.*, 2013b). Estos estudios no se han realizado en hembras en las que también es posible que el receptor a opioide de tipo  $\mu$  sufra este tipo de cambios tras la ejecución de la cópula.

Respecto a la regulación transcripcional de los receptores a opioides en el sistema nervioso central tras su activación, hay evidencia de que ésta se realiza de manera tejido-específica (Brodsky *et al.*, 1995; Law & Loh, 1999; Zhu *et al.*, 2012). Existen diversos estudios en los que han empleado diferentes técnicas para la medición de los ARNm de interés, aplicando estrategias, principalmente de índole farmacológica. Por ejemplo, Zhu y cols. (2012) evaluaron el efecto del tratamiento agudo y crónico de morfina sobre

los niveles del ARNm del gen que codifica para el receptor a opioide tipo  $\mu$  en el hipotálamo lateral y medial; la AMG, el NA, el caudado putamen y la hipófisis; por medio de la técnica de hibridación *in situ*. La administración única de 10 mg/kg/i.p. de morfina, no produjo cambios en el ARNm en ninguna de las áreas estudiadas, mientras que la administración por 10 días disminuyó este mensajero en el NA y el caudado putamen; en el resto de las áreas, no se observaron cambios. Otra evidencia del comportamiento heterogéneo de la expresión genética de los receptores a opioides es aquella hecha por Belkai y colaboradores, quienes midieron por medio de PCR cuantitativa, el ARNm de los genes que codifican para los receptores opioides  $\mu$ ,  $\kappa$  y  $\delta$ , tras una sola administración con efecto antinociceptivo equipotente de morfina, metadona y buprenorfina (evaluado en la prueba de retirada de la cola) en el estriado dorsal, el tálamo y NA de ratas macho (Belkai *et al.*, 2013). Se obtuvieron los tejidos a los 30 minutos, 1 y 4 horas posteriores a la administración de los fármacos. En el NA, no encontraron cambios en la expresión de ninguno de los genes en ningún grupo. Mientras que en el estriado hubo un aumento de la expresión del gen que codifica para el receptor  $\delta$  en un grupo al que se le administró morfina (30 minutos), y del gen que codifica para el  $\kappa$  en el grupo de 1 hora. En el tálamo aumentó el ARNm del gen que codifica para el receptor a opioide de tipo  $\kappa$  en los grupos que recibieron morfina (30 minutos) y metadona (30 minutos); mientras que el resto de áreas estudiadas en los demás horarios no mostró cambios en el ARNm. También se ha evaluado el efecto del tratamiento crónico de morfina que produjo tolerancia analgésica (evaluada en la prueba de la plancha caliente) sobre los niveles del ARNm en el asta dorsal de la médula espinal, el núcleo del rafé magno, la sustancia gris periacueductal, el hipotálamo y la corteza sensoriomotora. A pesar del desarrollo de esta tolerancia, no encontraron cambios en la expresión genética en ninguno de los horarios ni áreas estudiadas (Brodsky *et al.*, 1995). Tomando en conjunto los resultados anteriores, podemos señalar que a pesar de que existen cambios fisiológicos producidos por la administración de morfina (analgésia y tolerancia), estos no

se acompañan de cambios en la expresión de los genes para los receptores a opioides, estos cambios pueden estar limitados en el nivel postranscripcional, como los mencionados anteriormente. Asimismo, cabe señalar que la diversidad de los resultados va de la mano de las metodologías experimentales empleadas, las cuales han sido mayormente aquellas que involucran modelos de dolor y/o la administración de fármacos, mientras que poco se ha estudiado la regulación transcripcional ante conductas fisiológicas e intrínsecamente reforzantes como la sexual en las que el sistema opioide juega un papel central. En este sentido existe un reporte que ha señalado que en ratas durante el post parto hay mayor expresión del gen que codifica para el receptor a opioide de tipo  $\mu$  en el APOm, siendo aún mayor en aquellas hembras a las que se les permitió el contacto con sus crías (Akbari *et al.*, 2013); mientras que en la AMG Me no hubo cambios. Otro trabajo en ratas hembras en el día del post parto 7, a las cuales se les retiraron las crías por 4 o 18 horas, se midió el ARNm de los genes para los receptores a opioides de tipo  $\mu$  y  $\kappa$  en el hipotálamo mediobasal (Tavakoli-Nezhad & Arbogast, 2010). En aquellas que fueron separadas de sus crías por 18 horas se encontró un incremento en los niveles del ARNm de ambos genes. A pesar de que son escasos los reportes que apoyan la idea de que conductas ocurridas naturalmente como la maternal se acompañan de cambios en la expresión génica del sistema opioide endógeno, podemos mencionar algunos en otras conductas reforzantes ocurridas en otras especies. Por ejemplo, el gen que codifica para la preproencefalina, el precursor de las encefalinas, y el que codifica para el receptor a andrógenos incrementan su expresión en estorninos (un ave canora) machos en un área cerebral análoga a la APOm de mamíferos; mientras que la expresión del gen que codifica para el receptor  $\mu$  disminuye en aquellos que fueron expuestos por 20 minutos por 4 días a una hembra, lo que también indujo la emisión de cantos de cortejo. La conducta de canto en estas aves se considera reforzante y también, mediada por los opioides endógenos (Riters, 2010; Cordes *et al.*, 2015).

Es posible que la estimulación de los receptores a opioides dada por la actividad copulatoria recibida bajo nuestras condiciones no sea suficiente como para inducir cambios transcripcionales y/o que éstos sucedan a nivel proteico o traduccional, como lo reportado en machos e internalización del receptor a opioides de tipo  $\mu$  en el APOm tras una eyaculación (Coolen *et al.*, 2004). Para evaluar si esta activación a nivel de receptores reportada por el grupo de Coolen y posteriormente por el de Rodríguez-Manzo, realizamos una prueba piloto en machos sexualmente experimentados a los que se les permitió 1 h de cópula *ad libitum* y evaluamos los niveles del ARNm del gen que codifica para el receptor  $\mu$  opioide en el APOm. No encontramos cambios en esta expresión, corroborando el hecho de que las modificaciones observadas a nivel del receptor, no necesariamente se acompañan de cambios en la expresión genética. No obstante, no se excluye la posibilidad de que otros mecanismos postraduccionales que involucren a los receptores a opioides se lleven a cabo tras la conducta sexual, lo que requiere de futuras investigaciones.

## VIII. Conclusiones

La novedad sexual produce una mayor motivación sexual incentiva y una preferencia de pareja por un compañero sexual novedoso, lo que se suma a la evidencia de la presencia de efecto *Coolidge* en la hembra.

A lo largo de 4 horas de cópula consecutivas, la rata hembra presenta un declive en la proceptividad que se relaciona también con una disminución de la conducta sexual del macho; mientras que la receptividad sexual no se modifica. El establecimiento de la saciedad sexual en hembras debe ser estudiada desde otras perspectivas, tomando en consideración, por ejemplo, a los componentes motivacionales o apetitivos tras la cópula continua.

Diversos esquemas de cópula, regulada y no regulada, no inducen cambios en la expresión de los genes que codifican para los receptores a opioides en áreas cerebrales determinantes en la regulación de la conducta sexual femenina. Es posible que otros mecanismos, incluyendo aquellos a nivel postraducciona se echen a andar tras la conducta sexual en la rata hembra.

## **IX. Perspectivas**

Evaluar la expresión, activación e internalización de los receptores  $\mu$ ,  $\kappa$  y  $\delta$  en el APOm, HVM y AMG tras diversos esquemas de cópula.

Evaluar la MSI y la PP en hembras tras 4 horas de cópula.

Evaluar si la cópula durante 4 horas continuas sigue siendo reforzante para la hembra, mediante el paradigma de CPL en hembras tras 4 horas de CR y CnoR.

Evaluar el efecto de la novedad sexual en hembras que hayan copulado durante 4 horas con el M CON sobre la MSI y la PP.

Evaluar el efecto de la novedad sexual en hembras que hayan copulado repetidamente con un M CON sobre la MSI y la PP.

Evaluar, mediante microdiálisis, el efecto de la novedad sexual sobre la liberación de dopamina en las áreas importantes para las conductas motivadas tales como el NA, el APOm e HVM.

Evaluar si la conducta sexual induce cambios en los genes que codifican para los precursores de los ligandos a opioides POMC, PDIN, PEN en el HVM, la AMG y el APOm.

## X. Referencias

- Acosta-Martinez, M. & Etgen, A.M. (2002) The role of  $\delta$ -opioid receptors in estrogen facilitation of lordosis behavior. *Behav. Brain Res.*, **136**, 93-102.
- Adler, N.T., Davis, P.G. & Komisaruk, B.R. (1977) Variation in the size and sensitivity of a genital sensory field in relation to the estrous cycle in rats. *Horm. Behav.*, **9**, 334-344.
- Ágmo, A. (1999) Sexual motivation—an inquiry into events determining the occurrence of sexual behavior. *Behav. Brain Res.*, **105**, 129-150.
- Ágmo, A. (2007a) Chapter 2 - An incentive motivational framework and the description of sexual behaviors *Functional and Dysfunctional Sexual Behavior*. Academic Press, Oxford, pp. 30-76.
- Ágmo, A. (2007b) Chapter 6 - Neural control of sexual behavior *Functional and Dysfunctional Sexual Behavior*. Academic Press, Oxford, pp. 231-256.
- Ágmo, A. & Paredes, R. (1988) Opioids and sexual behavior in the male rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **30**, 1021-1034.
- Ágmo, A., Turi, A.L., Ellingsen, E. & Kaspersen, H. (2004) Preclinical models of sexual desire: conceptual and behavioral analyses. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **78**, 379-404.
- Akbari, E.M., Shams, S., Belay, H.T., Kaiguo, M., Razak, Z., Kent, C.F., Westwood, T., Sokolowski, M.B. & Fleming, A.S. (2013) The effects of parity and maternal behavior on gene expression in the medial preoptic area and the medial amygdala in postpartum and virgin female rats: A microarray study. *Behav. Neurosci.*, **127**, 913-922.
- Antaramian, A., González-Gallardo, A., García-Ugalde, C., Portillo, W. & Paredes, R.G. (2015) Steroid receptors and aromatase gene expression in different brain areas of copulating and sexually sluggish male rats. *J. Sex. Med.*, **12**, 2267-2275.
- Arida, R.M., Gomes da Silva, S., de Almeida, A.A., Cavalheiro, E.A., Zavala-Tecuapetla, C., Brand, S. & Rocha, L. (2015) Differential effects of exercise on brain opioid receptor binding and activation in rats. *J. Neurochem.*, **132**, 206-217.
- Arzate, D.M., Portillo, W., Corona, R. & Paredes, R.G. (2013) Repeated paced mating promotes the arrival of more newborn neurons in the main and accessory olfactory bulbs of adult female rats. *Neuroscience*, **232**, 151-60.
- Arzate, D.M., Portillo, W., Rodríguez, C., Corona, R. & Paredes, R.G. (2011) Extended paced mating tests induces conditioned place preference without affecting sexual arousal. *Horm. Behav.*, **59**, 674-680.
- Baxter, M.G. & Murray, E.A. (2002) The amygdala and reward. *Nat. Rev. Neurosci.*, **3**, 563-573.
- Belkai, E., Crete, D., Courtin, C., Noble, F. & Marie-Claire, C. (2013) Comparison of the transcriptional responses induced by acute morphine, methadone and buprenorphine. *Eur. J. Pharmacol.*, **711**, 10-18.
- Bergheim, D., Chu, X. & Ágmo, A. (2015) The function and meaning of female rat paracopulatory (proceptive) behaviors. *Behav. Processes*, **118**, 34-41.
- Bermant, G., Lott, D.F. & Anderson, L. (1968) Temporal characteristics of the Coolidge effect in male rat copulatory behavior. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, **65**, 447-452.
- Blaustein, J. & Mani, S. (2007) *Behavioral neurochemistry, neuroendocrinology and molecular neurobiology*. Springer, New York; Great Britain.
- Blaustein, J.D. & Erskine, M.S. (2002) Feminine sexual behavior: cellular integration of hormonal and afferent information in the rodent forebrain. In Donald, W.P., Arthur, P.A., Susan, E.F., Anne, M.E., Robert T. Rubin, A. Donald W. Pfaff, Robert, T.R. (Eds) *Hormones, Brain and Behavior*. Academic Press, San Diego, pp. 139-214.

- Bodnar, R.J. (2007) Endogenous opiates and behavior: 2006. *Peptides*, **28**, 2435-2513.
- Bonefeld, B.E., Elfving, B. & Wegener, G. (2008) Reference genes for normalization: A study of rat brain tissue. *Synapse*, **62**, 302-309.
- Brodsky, M., Elliott, K., Hynansky, A. & Inturrisi, C.E. (1995) CNS levels of mu opioid receptor (MOR-1) mRNA during chronic treatment with morphine or naltrexone. *Brain Res. Bull.*, **38**, 135-141.
- Broekman, M., de Bruin, M., Smeenk, J., Slob, A.K. & van der Schoot, P. (1988) Partner preference behavior of estrous female rats affected by castration of tethered male incentives. *Horm. Behav.*, **22**, 324-337.
- Clark, A.S., Pfeifle, J.K. & Edwards, D.A. (1981) Ventromedial hypothalamic damage and sexual proceptivity in female rats. *Physiol. Behav.*, **27**, 597-602.
- Coolen, L.M., Fitzgerald, M.E., Yu, L. & Lehman, M.N. (2004) Activation of  $\mu$  opioid receptors in the medial preoptic area following copulation in male rats. *Neuroscience*, **124**, 11-21.
- Cordes, M.A., Stevenson, S.A., Driessen, T.M., Eisinger, B.E. & Riters, L.V. (2015) Sexually-motivated song is predicted by androgen-and opioid-related gene expression in the medial preoptic nucleus of male European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Behav. Brain Res.*, **278**, 12-20.
- Corona, R., Larriva-Sahd, J. & Paredes, R.G. (2011) Paced-mating increases the number of adult new born cells in the internal cellular (granular) layer of the accessory olfactory bulb. *PLoS ONE*, **6**.
- Corona, R., Retana-Márquez, S., Portillo, W. & Paredes, R.G. (2016) Sexual behavior increases cell proliferation in the rostral migratory stream and promotes the differentiation of the new cells into neurons in the accessory olfactory bulb of female rats. *Front. Neurosci.*, **10**, 48.
- Chen, H.C., Wei, L.N. & Loh, H.H. (1999) Expression of  $\mu$ -,  $\kappa$ - and  $\delta$ -opioid receptors in P19 mouse embryonal carcinoma cells. *Neuroscience*, **92**, 1143-1155.
- Chu, X. & Agmo, A. (2014) Sociosexual behaviours in cycling, intact female rats (*Rattus norvegicus*) housed in a seminatural environment. *Behaviour*, **151**, 1143-1184.
- Dawson, S.J., Suschinsky, K.D. & Lalumière, M.L. (2013) Habituation of sexual responses in men and women: a test of the preparation hypothesis of women's genital responses. *J. Sex. Med.*, **10**, 990-1000.
- Dewsbury, D.A. (1981) Effects of novelty of copulatory behavior: The Coolidge effect and related phenomena. *Psychol. Bull.*, **89**, 464-482.
- Dickson, E.W., Hogrefe, C.P., Ludwig, P.S., Ackermann, L.W., Stoll, L.L. & Denning, G.M. (2008) Exercise enhances myocardial ischemic tolerance via an opioid receptor-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **294**, H402-H408.
- Eckersell, C.B., Popper, P. & Micevych, P.E. (1998) Estrogen-induced alteration of  $\mu$ -opioid receptor immunoreactivity in the medial preoptic nucleus and medial amygdala. *J. Neurosci.*, **18**, 3967-3976.
- Edwards, D.A. & Pfeifle, J.K. (1983) Hormonal control of receptivity, proceptivity and sexual motivation. *Physiol. Behav.*, **30**, 437-443.
- Ellingsen, E. & Ågmo, A. (2004) Sexual-incentive motivation and paced sexual behavior in female rats after treatment with drugs modifying dopaminergic neurotransmission. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **77**, 431-445.
- Erskine, M.S. (1992) Pelvic and pudendal nerves influence the display of paced mating behavior in response to estrogen and progesterone in the female rat. *Behav. Neurosci.*, **106**, 690-697.

- Erskine, M.S., Kornberg, E. & Cherry, J.A. (1989) Paced Copulation in Rats - Effects of Intromission Frequency and Duration on Luteal Activation and Estrus Length. *Physiol. Behav.*, **45**, 33-39
- Etgen, A.M. & Barfield, R.J. (1986) Antagonism of female sexual-behavior with intracerebral implants of antiprogestin RU-38486 -Correlation with binding to neural progestin receptors. *Endocrinology*, **119**, 1610-1617.
- Fernández-Guasti, A., Larsson, K. & Vega-Sanabria, J. (1986) Depression of postejaculatory ultrasonic vocalization by (+)-bicuculline. *Behav. Brain Res.*, **19**, 35-39.
- Fernández-Guasti, A. & Rodríguez-Manzo, G. (2003) Pharmacological and physiological aspects of sexual exhaustion in male rats. *Scand. J. Psychol.*, **44**, 257-263.
- Ferreira-Nuño, A., Morales-Otal, A., Paredes, R.G. & Velázquez-Moctezuma, J. (2005) Sexual behavior of female rats in a multiple-partner preference test. *Horm. Behav.*, **47**, 290-296.
- Flanagan-Cato, L.M. & McEwen, B.S. (1995) Pattern of Fos and Jun expression in the female rat forebrain after sexual behavior. *Brain Res.*, **673**, 53-60.
- García-Horsman, S.P., Ágmo, A. & Paredes, R.G. (2008) Infusions of naloxone into the medial preoptic area, ventromedial nucleus of the hypothalamus, and amygdala block conditioned place preference induced by paced mating behavior. *Horm. Behav.*, **54**, 709-716.
- Garduño-Gutiérrez, R., León-Olea, M. & Rodríguez-Manzo, G. (2013) Different amounts of ejaculatory activity, a natural rewarding behavior, induce differential mu and delta opioid receptor internalization in the rat's ventral tegmental area. *Brain Res.*, **1541**, 22-32.
- Giuliano, F., McKenna, K., Srilatha, B. & Pfau, J.G. (2008) Preclinical research and animal models. En: *Standard Practice in sexual medicine*. Blackwell Publishing Ltd, pp. 1-17.
- Goldman, J.M., Murr, A.S. & Cooper, R.L. (2007) The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.*, **80**, 84-97.
- Guarraci, F.A. & Clark, A.S. (2006) Ibotenic acid lesions of the medial preoptic area disrupt the expression of partner preference in sexually receptive female rats. *Brain Res.*, **1076**, 163-170.
- Hadjiconstantinou, M. & Neff, N.H. (2011) Nicotine and endogenous opioids: Neurochemical and pharmacological evidence. *Neuropharmacology*, **60**, 1209-1220.
- Hall, R.A. & Lefkowitz, R.J. (2002) Regulation of g protein-coupled receptor signaling by scaffold proteins. *Circ. Res.*, **91**, 672.
- Hoshina, Y., Takeo, T., Nakano, K., Sato, T. & Sakuma, Y. (1994) Axon-sparing lesion of the preoptic area enhances receptivity and diminishes proceptivity among components of female rat sexual behavior. *Behav. Brain Res.*, **61**, 197-204.
- Kane, B.E., Svensson, B. & Ferguson, D.M. (2006) Molecular recognition of opioid receptor ligands. *AAPS J.*, **8**, E126-E137
- Kelley, A.E. & Berridge, K.C. (2002) The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *J. Neurosci.*, **22**, 3306-3311.
- Kondo, Y. & Sakuma, Y. (2005) The medial amygdala controls the coital access of female rats: a possible involvement of emotional responsiveness. *Jpn. J. Physiol.*, **55**, 345-353.
- Kornberg, E. & Erskine, M.S. (1994) Effects of differential mating stimulation on the onset of prolactin surges in pseudopregnant rats. *Psychoneuroendocrinology*, **19**, 357-371.
- Koyama, Y., Fujita, I., Aou, S. & Oomura, Y. (1988) Proceptive presenting elicited by electrical stimulation of the female monkey hypothalamus. *Brain Res.*, **446**, 199-203.

- Krieger, M.S., Orr, D. & Perper, T. (1976) Temporal patterning of sexual behavior in the female rat. *Behav. Biol.*, **18**, 379-386.
- Law, P.Y. & Loh, H.H. (1999) Regulation of opioid receptor activities. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **289**, 607-624.
- Le Merrer, J., Becker, J.A.J., Befort, K. & Kieffer, B.L. (2009) Reward processing by the opioid system in the brain. *Physiol. Rev.*, **89**, 1379-1412.
- LeFevre, J. & McClintock, M.K. (1988) Reproductive senescence in female rats: a longitudinal study of individual differences in estrous cycles and behavior. *Biol. Reprod.*, **38**, 780-789.
- Lester, G.L.L. & Gorzalka, B.B. (1988) Effect of novel and familiar mating partners on the duration of sexual receptivity in the female hamster. *Behav. Neural Biol.*, **49**, 398-405.
- Lisk, R.D. & Baron, G. (1982) Female regulation of mating location and acceptance of new mating partners following mating to sexual satiety: The Coolidge effect demonstrated in the female golden hamster. *Behav. Neural Biol.*, **36**, 416-421.
- Lucio, R.A., Rodríguez-Piedracruz, V., Tlachi-López, J.L., García-Lorenzana, M. & Fernández-Guasti, A. (2014) Copulation without seminal expulsion: the consequence of sexual satiation and the Coolidge effect. *Andrology*, **2**, 450-457.
- Martínez, I. & Paredes, R.G. (2001) Only self-paced mating is rewarding in rats of both sexes. *Horm. Behav.*, **40**, 510-517.
- Mascó, D.H. & Carrer, H.F. (1980) Sexual receptivity in female rats after lesion or stimulation in different amygdaloid nuclei. *Physiol. Behav.*, **24**, 1073-1080.
- Mascó, D.H. & Carrer, H.F. (1984) Pathways conducting amygdaloid influence on feminine sexual behavior in the rat. *Behav. Brain Res.*, **11**, 205-212.
- Mathews, D. & Edwards, D.A. (1977) The ventromedial nucleus of the hypothalamus and the hormonal arousal of sexual behaviors in the female rat. *Horm. Behav.*, **8**, 40-51.
- McClintock, M.K. & Anisko, J.J. (1982) Group mating among Norway rats I. Sex differences in the pattern and neuroendocrine consequences of copulation. *Anim. Behav.*, **30**, 398-409.
- McClintock, M.K., Anisko, J.J. & Adler, N.T. (1982) Group mating among Norway rats II. The social dynamics of copulation: competition, cooperation, and mate choice. *Anim. Behav.*, **30**, 410-425.
- McDonald, J. & Lambert, D.G. (2011) Opioid mechanisms and opioid drugs. *Anaesth. Intens. Care Med.*, **12**, 31-35.
- Micevych, P. & Sinchak, K. (2007) The neurochemistry of limbic-hypothalamic circuits regulating sexual receptivity *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Behavioral Neurochemistry, Neuroendocrinology and Molecular Neurobiology*, pp. 151-193.
- Musatov, S., Chen, W., Pfaff, D.W., Kaplitt, M.G. & Ogawa, S. (2006) RNAi-mediated silencing of estrogen receptor  $\alpha$  in the ventromedial nucleus of hypothalamus abolishes female sexual behaviors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 10456-10460.
- Nelissen, K., Smeets, K., Mulder, M., Hendriks, J.J.A. & Ameloot, M. (2010) Selection of reference genes for gene expression studies in rat oligodendrocytes using quantitative real time PCR. *J. Neurosci. Methods*, **187**, 78-83.
- Newman, S.W. (1999) The medial extended amygdala in male reproductive behavior: a node in the mammalian social behavior network. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **877**, 242-257.
- Nyuyki, K.D., Waldherr, M., Baeuml, S. & Neumann, I.D. (2011) Yes, I am ready now: Differential effects of paced versus unpaced mating on anxiety and central oxytocin release in female rats. *PLoS ONE*, **6** (8), e23599.

- O'Connell, L.A. & Hofmann, H.A. (2011) The Vertebrate mesolimbic reward system and social behavior network: A comparative synthesis. *J. Comp. Neurol.*, **519**, 3599-3639.
- O'Connell, L.A. & Hofmann, H.A. (2011a) Genes, hormones, and circuits: An integrative approach to study the evolution of social behavior. *Front. Neuroendocrinol.*, **32**, 320-335.
- O'Connell, L.A. & Hofmann, H.A. (2012) Evolution of a vertebrate social decision-making network. *Science*, **336**, 1154-1157.
- Ogawa, S., Olazabal, U., Parhar, I. & Pfaff, D. (1994) Effects of intrahypothalamic administration of antisense DNA for progesterone receptor mRNA on reproductive behavior and progesterone receptor immunoreactivity in female rat. *J. Neurosci.*, **14**, 1766-1774.
- Parada, M., Chamas, L., Censi, S., Coria-Avila, G. & Pfafus, J.G. (2010) Clitoral stimulation induces conditioned place preference and Fos activation in the rat. *Horm.Behav.*, **57**, 112-118.
- Paredes, R.G. (2003) Medial preoptic area/anterior hypothalamus and sexual motivation. *Scand. J. Psychol.*, **44**, 203-212.
- Paredes, R.G. (2014) Opioids and sexual reward. *Pharmacol.Biochem.Behav.*, **121**, 124-131.
- Paredes, R.G. & Martínez, I. (2001) Naloxone blocks place preference conditioning after paced mating in female rats. *Behav.Neurosci.*, **115**, 1363-1367.
- 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 Res.*, **813**, 1-8.
- Paredes, R.G. & Vazquez, B. (1999) What do female rats like about sex? Paced mating. *Behav. Brain Res.*, **105**, 117-127.
- Pfaff, D.W. & Sakuma, Y. (1979) Facilitation of the lordosis reflex of female rats from the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J. Physiol.*, **288**, 189-202.
- Pfafus, J.G. & Gorzalka, B.B. (1987) Opioids and sexual behavior. *Neurosci.Biobehav. Rev.*, **11**, 1-34.
- Pfafus, J.G., Kleopoulos, S.P., Mobbs, C.V., Gibbs, R.B. & Pfaff, D.W. (1993) Sexual stimulation activates c-fos within estrogen-concentrating regions of the female rat forebrain. *Brain Res.*, **624**, 253-267.
- Pfafus, J.G. & Pfaff, D.W. (1992) Mu-, delta-, and kappa-opioid receptor agonists selectively modulate sexual behaviors in the female rat: differential dependence on progesterone. *Horm.Behav.*, **26**, 457-473.
- Phillips-Farfán, B.V. & Fernández-Guasti, A. (2007) c-Fos expression related to sexual satiety in the male rat forebrain. *Physiol. Behav.*, **91**, 609-619.
- Phillips-Farfán, B.V. & Fernández-Guasti, A. (2009) Endocrine, neural and pharmacological aspects of sexual satiety in male rats. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **33**, 442-455.
- Pleim, E.T., Brown, T.J., MacLusky, N.J., Etgen, A.M. & Barfield, R.J. (1989) Dilute estradiol implants and progestin receptor induction in the ventromedial nucleus of the hypothalamus: correlation with receptive behavior in female rats. *Endocrinology*, **124**, 1807-1812.
- Powers, J.B. (1972) Facilitation of lordosis in ovariectomized rats by intracerebral progesterone implants. *Brain Res.*, **48**, 311-325.
- Puehler, W., Zöllner, C., Brack, A., Shaqura, M.A., Krause, H., Schäfer, M. & Stein, C. (2004) Rapid upregulation of  $\mu$  opioid receptor mRNA in dorsal root ganglia in response to peripheral inflammation depends on neuronal conduction. *Neuroscience*, **129**, 473-479.
- Ribeiro, A.C., Musatov, S., Shteyler, A., Simanduyev, S., Arrieta-Cruz, I., Ogawa, S. & Pfaff, D.W. (2012) siRNA silencing of estrogen receptor- $\alpha$  expression specifically in

medial preoptic area neurons abolishes maternal care in female mice. *Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 16324-16329.

- Riters, L.V. (2010) Evidence for opioid involvement in the motivation to sing. *J. Chem. Neuroanat.*, **39**, 141-150.
- Rodríguez-Manzo, G. & Fernández-Guasti, A. (1995) Participation of the central noradrenergic system in the reestablishment of copulatory behavior of sexually exhausted rats by yohimbine, naloxone, and 8-OH-DPAT. *Brain Res. Bull.*, **38**, 399-404.
- Rodríguez-Manzo, G., Guadarrama-Bazante, I.L. & Morales-Calderón, A. (2011) Recovery from sexual exhaustion-induced copulatory inhibition and drug hypersensitivity follow a same time course: Two expressions of a same process? *Behav. Brain Res.*, **217**, 253-260.
- Rössler, A.-S., Pfau, J.G., Kia, H.K., Bernabé, J., Alexandre, L. & Giuliano, F. (2006) Melanocortin agonist, melanotan II, enhances proceptive sexual behaviors in the female rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **85**, 514-521.
- Seol, D., Choe, H., Zheng, H., Jang, K., Ramakrishnan, P., Lim, T.-H. & Martin, J. (2011) Selection of reference genes for normalization of quantitative real-time PCR in organ culture of the rat and rabbit intervertebral disc. *BMC Res Notes*, **4**, 1-8.
- Sinchak, K. & Micevych, P. (2003) Visualizing activation of opioid circuits by internalization of G protein-coupled receptors. *Mol. Neurobiol.*, **27**, 197-222.
- Sinchak, K., Mills, R.H., Eckersell, C.B. & Micevych, P.E. (2004) Medial preoptic area  $\delta$ -opioid receptors inhibit lordosis. *Behav. Brain Res.*, **155**, 301-306.
- Soebadi, M.A., Moris, L., Castiglione, F., Weyne, E. & Albersen, M. (2016) Advances in stem cell research for the treatment of male sexual dysfunctions. *Curr. Opin. Urol.*
- Suschinsky, K.D. & Lalumière, M.L. (2011) Prepared for anything? An investigation of female genital arousal in response to rape cues. *Psychol. Sci.*, **22**, 159-165.
- Tavakoli-Nezhad, M. & Arbogast, L.A. (2010) Mu and kappa opioid receptor expression in the mediobasal hypothalamus and effectiveness of selective antagonists on prolactin release during lactation. *Neuroscience*, **166**, 359-367.
- Tetel, M.J., Getzinger, M.J. & Blaustein, J.D. (1993) Fos expression in the rat brain following vaginal-cervical stimulation by mating and manual probing. *J. Neuroendocrinol.*, **5**, 397-404.
- Tlachi-López, J.L., Eguibar, J.R., Fernández-Guasti, A. & Lucio, R.A. (2012) Copulation and ejaculation in male rats under sexual satiety and the Coolidge effect. *Physiol. Behav.*, **106**, 626-630.
- Ventura-Aquino, E. & Fernández-Guasti, A. (2013) Reduced proceptivity and sex-motivated behaviors in the female rat after repeated copulation in paced and non-paced mating: Effect of changing the male. *Physiol. Behav.*, **120**, 70-76.
- Wang, G., Wei, L.N. & Loh, H.H. (2003) Transcriptional regulation of mouse  $\delta$ -opioid receptor gene by CpG methylation: involvement of SP3 and a methyl-CPG-binding protein, MBD2, in transcriptional repression of mouse  $\delta$ -opioid receptor gene in Neuro2A cells. *J. Biol. Chem.*, **278**, 40550-40556.
- Wei, L. N. & Loh, H.H. (2002) Regulation of opioid receptor expression. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2**, 69-75.
- Wei, L. N. & Loh, H.H. (2011) Transcriptional and epigenetic regulation of opioid receptor genes- present and future. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **51**, 75-97.
- Wei, L.N., Law, P.Y. & Loh, H.H. (2004) Post-transcriptional regulation of opioid receptors in the nervous system. *Front. Biosci.*, **9**, 1665-1679.
- Whitney, J.F. (1986) Effect of medial preoptic lesions on sexual behavior of female rats is determined by test situation. *Behav. Neurosci.*, **100**, 230-235.
- Zhu, Y., Hsu, M.-S. & Pintar, J.E. (1998) Developmental expression of the  $\mu$ ,  $\kappa$ , and  $\delta$  opioid receptor mRNAs in mouse. *J. Neurosci.*, **18**, 2538-2549.

- Zhu, Z.P., Badisa, R.B., Palm, D.E. & Goodman, C.B. (2012) Regulation of rat MOR-1 gene expression after chronic intracerebroventricular administration of morphine. *Mol. Med. Report.*, **5**, 513-516.
- Zipse, L.R., Brandling-Bennett, E.M. & Clark, A.S. (2000) Paced mating behavior in the naturally cycling and the hormone-treated female rat. *Physiol. Behav.*, **70**, 205-209