



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

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

**CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD DE LAS NEURONAS GABAÉRGICAS Y  
GLUTAMATÉRGICAS DEL ATV ASOCIADOS A LA SACIEDAD SEXUAL**

Tesis que presenta

**QFB Nashiely Yáñez Recéndis**

Para obtener el grado de Maestra en Ciencias en  
Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Directoras de Tesis:

**Dra. Gabriela Rodríguez Manzo**

**Dra. Edith Sánchez Jaramillo**

Ciudad de México

Abril 2019



Este trabajo se realizó en las instalaciones del laboratorio 18 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) Sede Sur y del laboratorio de Neuroendocrinología Molecular del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñíz”, bajo la dirección de la Dra. Gabriela Rodríguez Manzo y la Dra. Edith Sánchez Jaramillo. El trabajo fue financiado parcialmente por el proyecto CONACYT 220772 (GRM) y el Fondo para la Investigación del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñíz proyecto NC19110.0 (ESJ).



## AGRADECIMIENTOS

---

A la Doctora Gabriela Rodríguez Manzo por abrirme las puertas de su laboratorio sin conocerme, por aceptar hacer una cotutoría y sobre todo por el tiempo y los recursos que dedicó a la culminación de este proyecto.

A la Dra. Edith Sánchez Jaramillo por ser mi guía y por siempre impulsar mi crecimiento a nivel personal y profesional.

A mi comité sinodal por el tiempo dedicado a este proyecto, por sus invaluable aportaciones en cada seminario y por enriquecer con su experiencia este trabajo.

Al Dr. Francisco Pellicer por darme la oportunidad de crecer profesionalmente y otorgarme todas las facilidades necesarias para lograr este objetivo.

A la Dra. Martha León Olea por la ayuda que me brindó en cada momento, por sus consejos a lo largo del proyecto y también por el apoyo de su equipo de trabajo y las facilidades que me otorgó para usar el microscopio confocal y sus instalaciones, mil gracias.

A los investigadores del departamento de Farmacobiología del Cinvestav por sus enseñanzas, por los conocimientos y la experiencia que compartieron conmigo en cada clase.

A María del Pilar Quinteros y Víctor Manuel por su invaluable ayuda en adquirir parte de la bibliografía consultada en este proyecto.

A mis compañeros del laboratorio 18 y del laboratorio de Neuroendocrinología Molecular por el tiempo que dedicaron a los seminarios que presenté a lo largo de este proyecto y por sus comentarios, gracias chicos.

A Eduardo Sánchez Islas gracias por el tiempo que dedicaste a la adquisición de las fotos, por tu amistad incondicional, por acompañarme a lo largo del camino que bien sabes no fue fácil y sobre todo, por darme ánimos cada día que lo necesité.

A la Dra. Eva González por sus comentarios y consejos en la escritura de la tesis y por tener siempre las puertas abiertas de su laboratorio para conmigo.

A Ángeles por el cuidado de los animales utilizados en este proyecto y por las técnicas que compartió conmigo.

Al Sr. José Luis y Raúl Cardoso por su apoyo con las figuras.

Al “*Dream Team*” porque sin ustedes el posgrado no hubiera sido lo mismo, gracias por alentarme, aconsejarme siempre, por todos esos momentos tan padres que compartimos, chicos, los quiero.

A Brenda y Valeria, saben que las quiero y mucho, agradezco a dios haberme cruzado con ustedes en esta travesía llamada “vida” y lo más importante, gracias, por darme un ejemplo de fortaleza en la vida.

A mi familia que siempre tuvo palabras alentadoras y aguantaron este largo proceso.

A mis hermanas, que aunque no comparten mi amor por la investigación, forman una parte fundamental en mi vida. Gracias por siempre estar, las quiero mucho.

A mis sobrin@s por dejarme aprender de ustedes y por todos los momentos compartidos, pero sobre todo por formar parte de mi OHANA.

A todos mis amigos entrañables que siempre estuvieron dispuestos a darme ánimo y alentarme en cada paso de este proyecto.

Por último, pero no por ello menos importante, a dios por darme la oportunidad de ver cristalizado este sueño, que sin dudarlo fue un camino largo y difícil de recorrer, pero completamente satisfactorio haber llegado a la meta.

## DEDICATORIAS

---

A mi madre, por ser mi ejemplo de fortaleza siempre, por apoyar mis decisiones, aunque no siempre esté de acuerdo con ellas y sobre todo, por darme su amor de manera incondicional y acompañarme en cada paso que doy.

A MAC porque sin su apoyo y amor la culminación de este proyecto no hubiera sido posible. Gracias por estar a mi lado y coincidir.

A mis chicos Ángel y Mauricio que son el motor de mi vida y la razón de muchas de las cosas que hago, gracias por su amor inagotable y por estar a mi lado siempre. Los amo mis niños.

A la memoria de mi padre



## INDICE GENERAL

---

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
CONDUCTA SEXUAL MASCULINA	1
SACIEDAD SEXUAL	4
SISTEMA MESOLÍMBICO DOPAMINÉRGICO	6
ÁREA TEGMENTAL VENTRAL	8
GABA	12
GLUTAMATO	15
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>17</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>17</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
<b>METODOLOGÍA</b>	<b>19</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>36</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>49</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>56</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>57</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>58</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>65</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Patrón copulatorio de la rata macho .....	4
<b>Figura 2:</b> Sistema Mesolímbico Dopaminérgico en el ATV .....	6
<b>Figura 3:</b> Distribución rostral-caudal de los núcleos que forman el ATV .....	8
<b>Figura 4:</b> Aferencias y eferencias del ATV .....	11
<b>Figura 5:</b> Componentes del sistema GABAérgico .....	14
<b>Figura 6:</b> Diseño experimental de la administración intra-ATV de OxA sobre la saciedad sexual .....	22
<b>Figura 7:</b> Diseño experimental para las hibridaciones fluorescentes de VGluT2 y GAD 67 .....	34
<b>Figura 8:</b> DOI para el RNAm de VGluT2 .....	36
<b>Figura 9:</b> Número de partículas en la hibridación fluorescente para VGluT2 .....	37
<b>Figura 10:</b> Número de células positivas en la hibridación fluorescente para VGluT2 .....	38
<b>Figura 11:</b> Comparación de la DOI, el número de partículas y el número de células del control experto vs sexualmente naive para VGluT2 .....	39
<b>Figura 12:</b> Fotomicrografías de la hibridación fluorescente para el RNAm de VGluT2 .....	40
<b>Figura 13:</b> DOI para el RNAm de GAD 67 .....	41
<b>Figura 14:</b> Número de partículas en la hibridación fluorescente para GAD 67 .....	42
<b>Figura 15:</b> Número de células positivas en la hibridación fluorescente para GAD 67 .....	43
<b>Figura 16:</b> Comparación de la DOI, el número de partículas y el número de células del control experto vs sexualmente naive para GAD 67 .....	44
<b>Figura 17:</b> Fotomicrografías de la hibridación fluorescente para el RNAm de GAD 67 .....	45
<b>Figura 18:</b> Efecto de la orexina A intra ATV en machos sexualmente saciados ....	46
<b>Figura 19:</b> Localización de los sitios de inyección de orexina A .....	47
<b>Figura 20:</b> Esquema del resumen de la discusión del RNAm de VGluT2 y GAD 67 en el ATV .....	53
<b>Figura 21:</b> Esquema del resumen de la discusión de la administración de orexina A intra ATV .....	55

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Digestión de los plásmidos que contienen las secuencias codificadoras para VGluT2 o GAD 67 .....	24
<b>Tabla 2:</b> Composición del buffer de hibridación .....	28
<b>Tabla 3:</b> Composición de la mezcla de revelado para obtener la señal del anti-dig con el fluorocromo Alexa 488 .....	31
<b>Tabla 4:</b> Actividad ambulatoria espontánea .....	48

## ABREVIATURAS

---

APOm	Área preóptica media	GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
ATV	Área tegmental ventral	I	Intromisión
ATVr	Área tegmental ventral rostral	IF	Núcleo interfascicular
BNST	Núcleo del lecho de la estría terminal	IPE	Intervalo post eyaculatorio
cNLI	Núcleo Linear caudal	KHz	Kilo Hertz
CPF	Corteza prefrontal	LE	Latencia de eyaculación
DA	Dopamina	LH	Hipotálamo lateral
DNA	Ácido desoxirribonucleico	LHb	Habénula lateral
DRN	Núcleo del rafé dorsal	LI	Latencia de Intromisión
DTT	Dithiothreitol	LM	Latencia de Monta
E	Eyaculación	LTDg	Núcleo tegmental laterodorsal
EDTA	Etilen-diamino-tetraacético	LTP	Potenciación a largo plazo
FISH	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente	M	Monta
GABA	Ácido gamma aminobutírico	MLD	Mesolímbico Dopaminérgico
GAD	Glutamato descarboxilasa	mPFC	Corteza prefrontal media
GAD 65	Glutamato descarboxilasa isoforma 65	MSNs	Neuronas espinosas medias
GAD 67	Glutamato descarboxilasa isoforma 67	NAcc	Núcleo accumbens
		OxA	Orexina A

OxB	Orexina B	SNC	Sistema Nervioso central
PAG	Sustancia gris periacueductal	SSC	Buffer de citrato de sodio
PBP	Núcleo parabraquial	TA	Temperatura ambiente
PBS	Buffer salino de fosfatos	TBE	Tris borato EDTA
PFA	Paraformaldehído	TEA	Trietanolamina
PIF	Núcleo para interfascicular	TSA	Tiramida estreptavidina
PKA	Proteína cinasa A	VGluT1	Transportador vesicular de glutamato tipo 1
PN	Núcleo paranigral	VGluT2	Transportador vesicular de glutamato tipo 2
PPTg	Tegmento pedúnculo pontino	VGluT3	Transportador vesicular de glutamato tipo 3
rNLi	Núcleo caudal rostral	VGluT's	Transportadores vesiculares de glutamato
RMTg	Núcleo tegmental rostromedial	VP	Pálido ventral
RNA	Ácido ribonucleico		
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero		
SDS	Dodecil sulfato de sodio		

## RESUMEN

---

Si se permite a una rata macho sexualmente experta copular *ad libitum* con una hembra sexualmente receptiva, ésta eyaculará repetidamente hasta estar sexualmente saciado. Este proceso induce la aparición de una inhibición sexual de larga duración (72 hrs). La cópula es una conducta recompensante que activa al sistema mesolímbico dopaminérgico y aumenta la liberación de dopamina (DA) en el núcleo accumbens (NAcc). Durante la cópula, la actividad de las neuronas GABAérgicas del área tegmental ventral (ATV) se inhibe mientras que la de las neuronas glutamatérgicas aumenta, lo que permite que haya una liberación fásica de DA en el NAcc. Se sabe que durante el desarrollo de la saciedad sexual los niveles de DA permanecen elevados, pero no se sabe si los cambios en la actividad de las neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas del ATV se mantienen. En este trabajo se investigaron posibles cambios en la expresión del RNAm del transportador vesicular de glutamato (VGluT2) y del RNAm de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD 67), como indicadores de la actividad de neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas, respectivamente. La determinación se hizo por hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en el ATV de ratas macho sexualmente expertas que eyacularon una vez o que copularon hasta la saciedad 24 hrs antes del sacrificio y en machos sexualmente expertos que no tuvieron actividad sexual previa al sacrificio. Se incluyó también un grupo de ratas sexualmente naïve. La expresión de los RNAm se determinó por la densidad óptica integrada (DOI), el número de partículas fluorescentes y el número de células positivas para cada RNAm. También se investigó si la inducción farmacológica de un aumento en las concentraciones de DA en el NAcc revierte la saciedad sexual. Para ello se utilizaron ratas sexualmente saciadas, implantadas bilateralmente con cánulas dirigidas al ATV, por las que se administraron diferentes concentraciones de orexina A (0.01-0.3 nM) directamente en el ATV a las 24 hrs post-saciedad. La orexina es un neuropéptido que se ha reportado que induce la liberación de DA en el NAcc cuando se administra directamente en el ATV. Los resultados mostraron un aumento significativo en la expresión del RNAm de VGluT2 y una clara tendencia a la disminución del RNAm de GAD 67 en el ATV en los machos sexualmente saciados. No hubo diferencias en la expresión de ninguno de los RNAm entre los machos sexualmente naïve y los sexualmente expertos. Por otro lado, la orexina A revirtió la saciedad sexual a todas las concentraciones probadas. Se concluye que la cópula intensa que tiene lugar durante el desarrollo de la saciedad sexual promueve un aumento en la transcripción del gen que codifica para el VGluT2 y la disminución en la transcripción del gen que codifica para la GAD 67 en las neuronas del ATV, lo que coincide con una activación constante de las neuronas glutamatérgicas y una inhibición constante de las GABAérgicas. Así mismo se concluye que un aumento en los niveles de DA en el NAcc es suficiente para revertir la inhibición sexual en ratas sexualmente saciadas.

## ABSTRACT

---

If a sexually experienced male rat is allowed to copulate ad libitum with a sexually receptive female, it will ejaculate repeatedly until becoming sexually satiated. This process induces the appearance of a long-lasting sexual behavior inhibition (72 h). Copulation is a rewarding behavior that activates the mesolimbic dopaminergic system, increasing dopamine (DA) release in the nucleus accumbens (NAcc). During copulation, the activity of the GABAergic neurons of the ventral tegmental area (VTA) is inhibited, while that of glutamatergic neurons is increased, allowing a phasic release of DA in the NAcc. It is known that DA levels remain elevated during sexual satiety development, but it is not known if the changes in the activity of GABAergic and glutamatergic neurons in the VTA are maintained. In this study we investigated possible changes in mRNA expression of the vesicular glutamate transporter (VGluT2) and the glutamate decarboxylase 67 (GAD 67) enzyme, as indicators of glutamatergic and GABAergic neuronal activity, respectively. mRNA determinations were made by fluorescent in situ hybridization (FISH) in the VTA of sexually experienced male rats that ejaculated once or copulated to satiety 24 h prior to sacrifice, and were compared with sexually experienced males that did not execute sexual activity prior to sacrifice. A group of sexually naïve male rats was also included. mRNA expression was determined by the integrated optical density (DOI), the number of fluorescent particles and the number of positive cells for each mRNA. We also investigated if the pharmacological induction of an increase in DA concentrations in the NAcc reversed sexual satiety. To this aim sexually exhausted male rats, implanted with bilateral cannula directed to the VTA were infused with different concentrations of orexin A (0.01-0.3 nM), 24 h after copulation to satiety. Orexin is a neuropeptide reported to induce DA release in the NAcc when infused into the VTA. Results showed a significant increase in the expression level of VGluT2 mRNA and a clear tendency towards a decrease in the expression level of GAD 67 mRNA in the sexually exhausted males. No differences in the expression level of either mRNA were found between sexually naïve and sexually experienced males. Besides, orexin A reversed sexual satiety at all tested concentrations. It is concluded that intense copulation during sexual satiety development promotes an increase in the transcription of the gene encoding for VGluT2 and a decrease in the transcription of the gene encoding for GAD 67 in the VTA, which coincide with a constant activation of glutamatergic neurons and a constant inhibition of GABAergic neurons. It is also concluded that an increase in NAcc DA levels is sufficient to reverse the sexual inhibition of sexually satiated rats.



## INTRODUCCIÓN

---

### **CONDUCTA SEXUAL MASCULINA**

La conducta sexual de la rata es innata y altamente estereotipada, es decir, sigue un mismo patrón conductual en todos los individuos de la especie. Su principal finalidad es mantener la supervivencia de las especies a través del paso de su reservorio genético a la siguiente generación. En la rata macho, la conducta sexual comprende un complejo patrón de respuestas genitales y somatomotoras que son causadas, dirigidas y mantenidas por señales tanto internas como externas. Esta conducta está formada por conductas pre-copulatorias y copulatorias (Hull & Rodríguez-Manzo, 2017).

#### **Conducta Precopulatoria**

La conducta precopulatoria es aquella que, como su nombre lo indica, se presenta antes de la cópula. En el caso de los roedores macho, consiste de un periodo de investigación anogenital, además de la emisión de vocalizaciones ultrasónicas de alrededor de 50 KHz que son emitidas con la intención de generar excitación en la pareja del sexo opuesto (Geyer & Barfield, 1978). En el preámbulo de la cópula, la rata macho realiza el marcaje de su territorio con orina, lo cual posee un valor incentivo para la rata hembra.

#### **Conducta copulatoria**

En la conducta copulatoria se pueden distinguir dos fases: una fase apetitiva y una fase consumatoria. Esta última, está constituida por tres respuestas motoras particulares: la conducta de monta, la conducta de intromisión y la conducta de eyaculación.

- I. *Conducta de Monta (M)*: durante esta conducta la rata macho monta a la hembra desde atrás, posando sus patas delanteras sobre ella y realizando movimientos pélvicos sin lograr la inserción peneana intravaginal. Posteriormente, el macho desmonta a la hembra muy lentamente.
- II. *Conducta de Intromisión (I)*: durante la conducta de intromisión el macho monta a la hembra dorsalmente y al igual que en la conducta de monta realiza movimientos pélvicos, logrando la inserción intravaginal del pene, gracias a que la hembra receptiva asume la postura de lordosis, que es una curvatura de la columna vertebral de la hembra y va acompañada del movimiento de la cola hacia un lado. Después de una intromisión, el macho desmonta a la hembra de manera abrupta, en reversa y aseando sus genitales.
- III. *Conducta de Eyacuación (E)*: Esta conducta ocurre después de múltiples montas e intromisiones. En ella, el macho logra una intromisión y realiza movimientos pélvicos, uno de los cuales es más prolongado y profundo y coincide con la emisión del líquido seminal. Una vez que el macho ha eyaculado, desmonta a la hembra de manera lenta, frecuentemente levantando las patas delanteras y, en ocasiones, cae de lado para terminar aseando sus genitales.

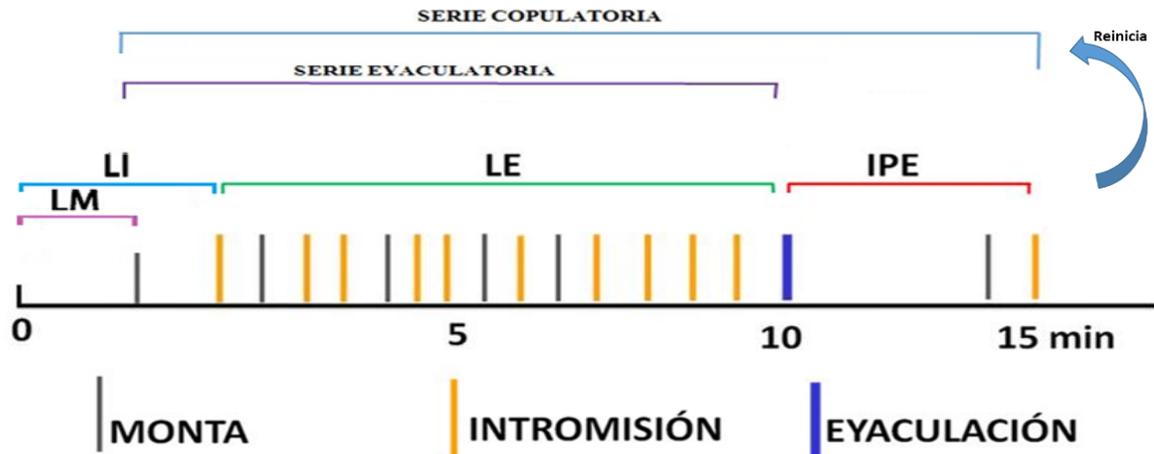
Estas 3 respuestas conductuales integran lo que se ha denominado el *patrón copulatorio de la rata macho*, que consiste en la ejecución de varias montas e intromisiones intercaladas que culminan con la eyacuación. Después de ésta, el macho entra en una etapa de inactividad sexual denominada intervalo post-eyaculatorio (IPE), durante el cual no responde a la estimulación sexual. Este periodo tiene una duración de 5-10 minutos después de una primera eyacuación; transcurrido este tiempo, el macho puede reiniciar la cópula.

El carácter estereotipado de la conducta sexual de la rata macho ha permitido el establecimiento de medidas tanto temporales como numéricas para evaluarla. Estas medidas incluyen a:

- *La latencia de monta (LM)*: es el tiempo que transcurre desde que la hembra receptiva y el macho entran en contacto hasta que éste realiza la primera monta o intromisión.
- *La latencia de intromisión (LI)*: es el tiempo que transcurre desde que se ponen en contacto el macho y la hembra receptiva hasta que éste realiza la primera intromisión de la serie.
- *La latencia de eyaculación (LE)*: es el tiempo que transcurre desde que el macho realizó la primera intromisión hasta que se presenta la conducta de eyaculación.
- *El intervalo post-eyaculatorio (IPE)*: que consiste en el periodo que transcurre desde la eyaculación hasta que se presenta la primera intromisión de una nueva serie copulatoria.
- *El número de montas (M)* que preceden a la eyaculación.
- *El número de intromisiones (I)* que se presentan antes de que el animal eyacule.
- *El número de eyaculaciones (E)* que presenta el macho en el período de observación.

A la serie de eventos que se presentan desde la intromisión hasta la eyaculación se les denomina *serie eyaculatoria* y, si se incluye al IPE, entonces la serie recibe el nombre de *serie copulatoria*.

Si bien la conducta sexual es una conducta innata, ésta mejora con la práctica, lográndose la estabilización del patrón copulatorio en los animales con experiencia sexual. En la figura 1 se representan los componentes del patrón copulatorio de la rata macho.



**Figura 1: Representación del patrón copulatorio de la rata macho.** Se muestra esquemáticamente la secuencia de montas (barras grises) e intromisiones intercaladas (barras ocreas) que preceden a la eyaculación (barra azul). Los períodos que corresponden a los parámetros temporales de la cópula (latencia de monta LM, latencia de Intromisión LI, latencia de eyaculación LE y el intervalo post-eyaculatorio IPE) se representan en corchetes violeta, azul, verde y rojo, respectivamente.

## SACIEDAD SEXUAL

Si a una rata macho se le permite copular *ad libitum* con una misma hembra sexualmente receptiva, realizará entre 5 y 12 eyaculaciones consecutivas (7 en promedio) antes de dejar de copular. Se considera entonces que el animal está sexualmente saciado. El criterio para considerar que una rata macho ha alcanzado la saciedad sexual, es que haya transcurrido un periodo de 90 minutos desde que el animal realizó la última eyaculación, sin que presente otra eyaculación. Una vez que ha dejado de copular, la rata macho permanece sexualmente inhibida por un período de 72 horas y posteriormente va recuperando paulatinamente su capacidad sexual, requiriendo de un período de hasta 15 días de inactividad sexual para recuperar su capacidad eyaculatoria inicial (Beach & Jordan, 1956; Rodríguez-Manzo y cols., 2011).

La inhibición sexual de las ratas sexualmente exhaustas se manifiesta de dos maneras diferentes a las 24 hrs post saciedad: dos terceras partes de la población no responde a la presencia de una hembra sexualmente receptiva y la otra tercera parte puede copular hasta la eyaculación, pero no reinicia la cópula después de esa eyaculación (Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1994).

Las ratas sexualmente saciadas presentan algunas alteraciones fisiológicas, además de la inhibición sexual de larga duración, al compararlas con ratas no saciadas. Entre ellas destacan una hipersensibilidad generalizada a fármacos, es decir, que en los animales sexualmente saciados se requieren dosis menores de fármaco para generar un efecto determinado con respecto a la dosis necesaria para obtener el mismo efecto en ratas no saciadas (Rodríguez-Manzo y cols., 2011). Así mismo, en las ratas sexualmente saciadas se pierden los efectos facilitadores sobre la cópula producidos por la estimulación eléctrica de áreas cerebrales involucradas en su expresión, tales como el área preóptica media (APOm), el área tegmental ventral (ATV) y el núcleo accumbens (NAcc) (Rodríguez-Manzo y cols., 2000; Rodríguez-Manzo & Pellicer 2007; 2010).

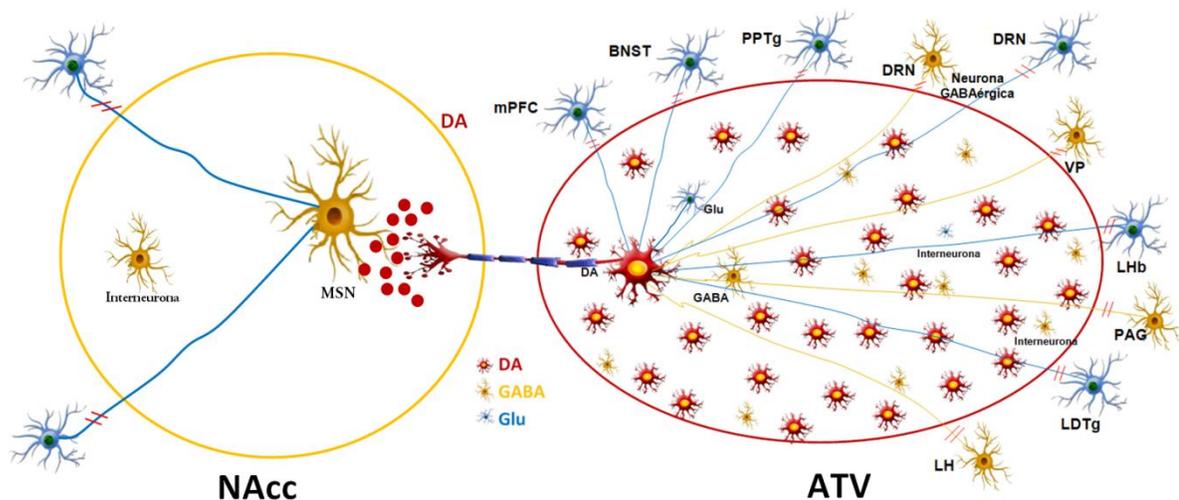
## **DOPAMINA Y SACIEDAD SEXUAL**

La inhibición sexual característica de la saciedad es “reversible”, datos de nuestro laboratorio han demostrado que en el mantenimiento de la inhibición sexual participan diferentes sistemas de neurotransmisión, entre los que podemos mencionar el sistema GABAérgico (Rodríguez-Manzo & Canseco-Alba, 2017), sistema serotoninérgico y noradrenérgico (Rodríguez-Manzo, 1999), opioide (Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1995), entre otros. El parámetro que nos indica que un tratamiento farmacológico revierte la saciedad sexual es el reinicio de la cópula, es decir un aumento en el porcentaje de animales saciados que tienen conducta sexual hasta presentar una eyaculación y reiniciar una segunda serie eyaculatoria después de eyacular (Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1994). La administración sistémica de yohimbina (antagonista  $\alpha_2$  adrenérgico) y un agonista de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> serotoninérgicos revirtió la inhibición sexual en machos saciados (Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1994), otro hallazgo

importante permitió determinar que la administración intra-ATV de naltrexona (antagonista opioide no específico) indujo la cópula en machos saciados (Garduño-Gutiérrez y cols., 2013), así también, la administración de bicuculina permitió la cópula en machos sexualmente saciados, sin embargo este mismo tratamiento no tuvo ningún efecto en la conducta sexual en machos expertos (Rodríguez-Manzo & Canseco-Alba, 2017). Estos antecedentes permitieron establecer la hipótesis de que la reversión de la saciedad sexual implica una interacción directa o indirecta con el sistema dopaminérgico.

## SISTEMA MESOLÍMBICO DOPAMINÉRGICO

El sistema mesolímbico dopaminérgico (MLD), también conocido como “*el circuito de la recompensa*”, está formado por neuronas dopaminérgicas cuyos somas se localizan en el ATV y sus axones proyectan al NAcc y a la corteza prefrontal (CPF), principalmente (Ikemoto, 2010). En la figura 2 se esquematiza cómo está constituido el MLD, así como las principales poblaciones neuronales del ATV.



**Figura 2:** Representación esquemática del MLD en la que se presentan las tres poblaciones principales de neuronas que conforman al ATV (neuronas dopaminérgicas, GABAérgicas y glutamatergicas), así como las aferencias de neuronas GABAérgicas y glutamatergicas que provienen de otras regiones cerebrales y regulan la actividad de las neuronas dopaminérgicas en el ATV. El círculo amarillo representa la proyección de la neurona dopaminérgica del ATV hacia el núcleo accumbens.

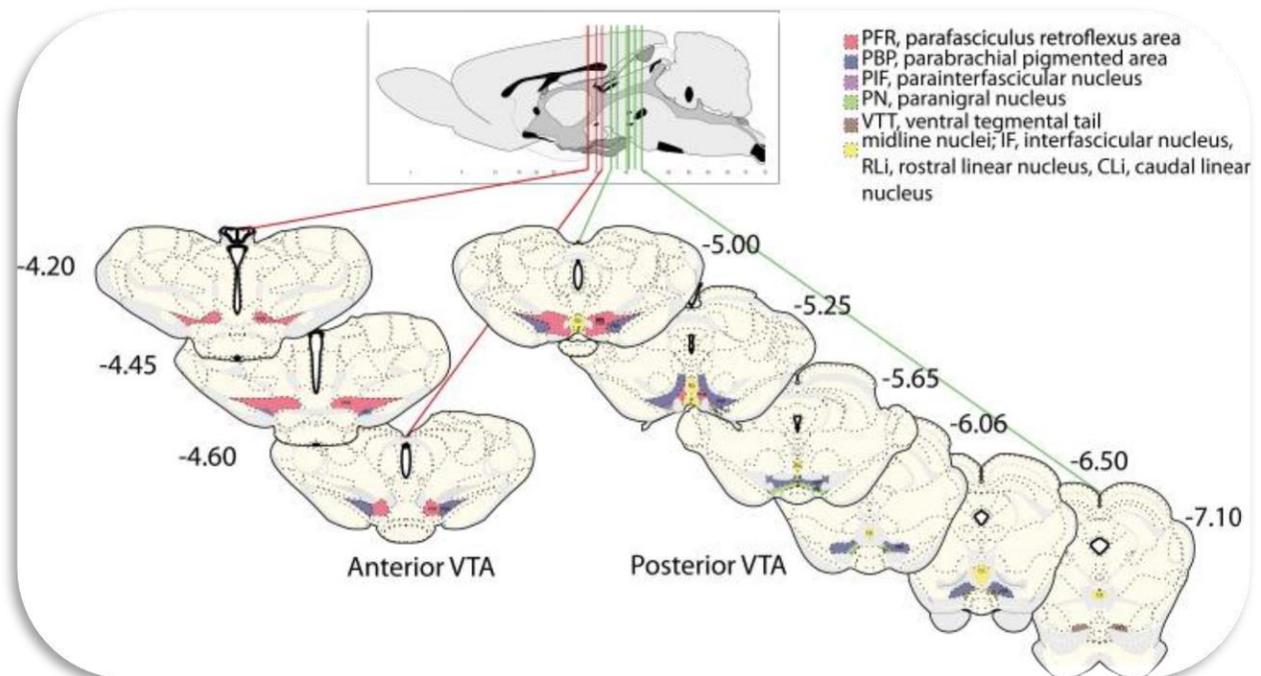
La actividad de las neuronas dopaminérgicas del ATV es modulada por neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas. En condiciones basales, las neuronas GABAérgicas del ATV mantienen un tono inhibitorio sobre las neuronas dopaminérgicas, lo que provoca que éstas mantengan una liberación tónica de DA en el NAcc (Lobb y cols., 2011). La exposición y/o experimentación de estímulos recompensantes provoca un cambio en la tasa de disparo de las neuronas que se acompaña de una liberación fásica de DA en el NAcc. Ese cambio está mediado por la remoción del control inhibitorio que ejercen las interneuronas GABAérgicas (Jonhson & North, 1992) y por la liberación de glutamato que estimula a las neuronas dopaminérgicas (Bariselli y cols, 2016).

El sistema MLD desempeña un papel importante en la regulación de las conductas motivadas, como son la ingesta de alimento y la conducta sexual (Berridge, 2007). En la rata macho, se ha demostrado que la conducta sexual activa al MLD. Así, en estudios de microdiálisis se determinó que cuando a la rata macho se le presenta una hembra sexualmente receptiva se produce un incremento de la liberación de DA en el NAcc (Pfaus y cols., 1990; Pfaus & Phillips, 1991; Damsma y cols., 1992). Este aumento es aún mayor durante la cópula y se mantiene durante las eyaculaciones sucesivas que se presentan durante la cópula hasta la saciedad, lo que demuestra que el sistema MLD se activa constantemente durante el desarrollo de la saciedad sexual (Fiorino y cols., 1997; Canseco-Alba, en preparación). Además, estudios de electrofisiología muestran que la actividad de las neuronas del NAcc de la rata macho cambia durante la ejecución de las diferentes respuestas conductuales que integran la cópula; esto se observa como cambios en la frecuencia de disparo neuronal (Matsumoto y cols., 2012).

## Área tegmental ventral (ATV)

El ATV es la estructura en la que, se origina el sistema MLD. Se localiza en el mesencéfalo o cerebro medio y fue descrita por primera vez por Tsai en 1925 (Tsai, 1925; Nauta, 1958). La definición del ATV ha ido cambiando; inicialmente se consideraba que estaba formada por cinco núcleos y por neuronas dopaminérgicas solamente. En la actualidad se considera que esta estructura está conformada por el ATV rostral (ATVr), el núcleo pigmental parabranchial (PBP), el núcleo parainterfascicular (PIF), el núcleo paranigral (PN), el núcleo interfascicular (IF), el núcleo linear caudal y rostral (cNLI y rNLI) y el núcleo tegmental rostromedial (RMTg por sus siglas en inglés), que también recibe el nombre de “cola del ATV” (Sánchez-Catalán y cols., 2014).

En la figura 3 se representa la distribución rostral-caudal del ATV según el atlas de Paxinos (Paxinos & Watson., 2009), así como los núcleos que la conforman.



**Figura 3:** Representación de la distribución rostral-caudal del área tegmental ventral (ATV). Las coordenadas indican la anterioridad respecto a bregma (tomada de Holly & Miczek, 2016).

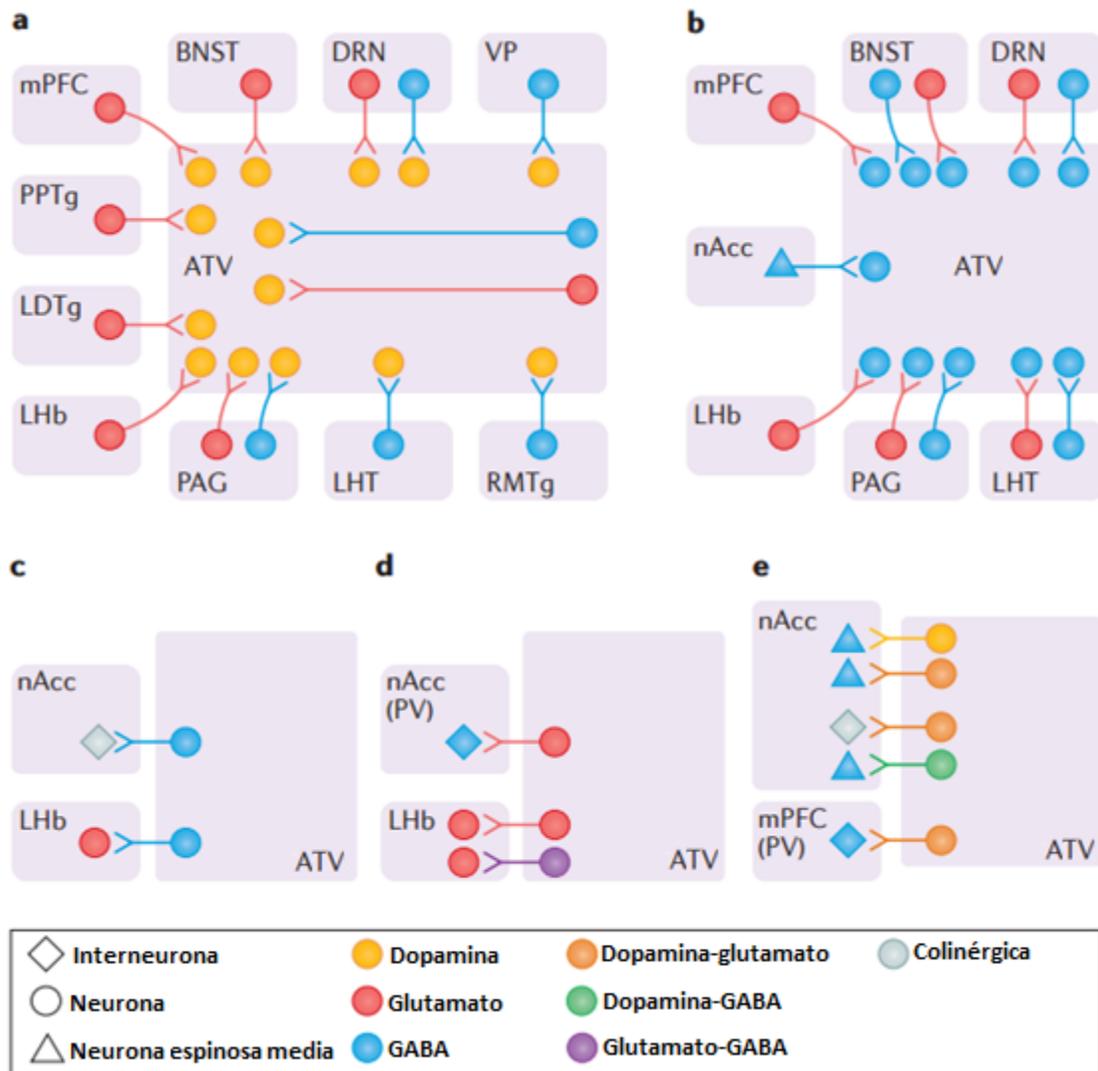
Hasta hace poco se consideraba que el ATV estaba formado por neuronas *dopaminérgicas* y neuronas *no dopaminérgicas*. En la actualidad se sabe que éstas últimas son de naturaleza GABAérgica y glutamatérgica. La proporción de estos tres tipos de neuronas es diferente, ya que las neuronas dopaminérgicas conforman entre el 55-56%, mientras que aproximadamente 22% de las neuronas son GABAérgicas (Johnson & North, 1992; Margolis y cols., 2012) y 2-3% son glutamatérgicas (Bariselli y cols., 2016). Con base en la diversidad de la población neuronal del ATV, en 2007 Yamaguchi clasificó al ATV en región anterior, región media y región posterior; cada una formada por diferentes núcleos. En el 2014, Sánchez y colaboradores hicieron una distinción entre ATV anterior y ATV posterior (Sánchez-Catalán y cols., 2014). Los criterios para hacer estas distinciones incluyeron diferencias en conectividad, en la proporción de los distintos tipos celulares (neuronas dopaminérgicas, GABAérgicas, glutamatérgicas, etc.) y en la expresión diferencial de receptores como los GABA<sub>A</sub> y los D2 (Sánchez-Catalán y cols., 2014).

### **Conectividad del ATV**

El mapeo de las proyecciones que recibe o envía el ATV a otras estructuras cerebrales ha permitido establecer la existencia de un patrón complejo de redes neuronales. Las neuronas dopaminérgicas del ATV reciben aferencias glutamatérgicas provenientes de la corteza prefrontal medial (mPFC), del tegmento pedúnculo pontino (PPTg), del núcleo tegmental latero dorsal (LDTg), de la habénula lateral (LHb), de la sustancia gris periacueductal (PAG), del núcleo del lecho de la estría terminal (BNST) y del núcleo del rafé dorsal (DRN). A su vez, reciben aferencias GABAérgicas del RMTg también conocido como cola del ATV, de la PAG, el DRN, el hipotálamo lateral (LH) y el pálido ventral (VP). Por otro lado, las neuronas GABAérgicas del ATV reciben aferencias glutamatérgicas provenientes de la LHb y la mPFC y aferencias GABAérgicas del NAcc. También reciben inervaciones GABAérgicas y glutamatérgicas del PAG, DRN, LH y el BNST. La inervación glutamatérgica proveniente del núcleo preóptico antero

ventral, preóptico medial y preóptico mediano, es varias veces mayor a la innervación GABAérgica proveniente de los mismos núcleos (Kalló y cols., 2015).

Respecto a las proyecciones que surgen del ATV, las neuronas GABAérgicas establecen sinapsis con interneuronas colinérgicas del NAcc y con neuronas glutamatérgicas de la LHb; las neuronas glutamatérgicas establecen sinapsis con neuronas de la LHb y del NAcc que expresan parvalbúmina, mientras que las neuronas del ATV que co-liberan glutamato y GABA establecen sinapsis con neuronas de la LHb. Las neuronas dopaminérgicas del ATV establecen sinapsis con las neuronas espinosas medias (MSN por sus siglas en inglés) del NAcc. Las neuronas que co-liberan dopamina y glutamato también hacen sinapsis con las MSN del NAcc, además de hacerlo con interneuronas colinérgicas del NAcc e interneuronas GABAérgicas de la mPFC que expresan parvalbúmina. Por último, las neuronas que coliberan dopamina y GABA establecen sinapsis con las MSNs del NAcc (Morales & Margolis, 2017). Todas estas conexiones se representan en la figura 4.



**Figura 4:** Aferencias y eferencias de las neuronas del ATV. En el panel **a** del esquema se resumen las aferencias que reciben las neuronas DA del ATV, en el panel **b** las aferencias que reciben las neuronas GABAérgicas del ATV, **c** resume las eferencias de neuronas GABAérgicas del ATV al NAcc y el LHb, y el panel **d** las eferencias de neuronas glutamatérgicas del ATV y neuronas mixtas que coliberan glutamato y GABA. En el panel **e** se muestran las eferencias de neuronas dopaminérgicas y neuronas mixtas que coliberan DA y glutamato o DA y GABA en el ATV al NAcc (mPFC: corteza prefrontal medial, PPTg: núcleo tegmental pedúnculo pontino, LDTg: núcleo tegmental latero dorsal, LHb: habénula lateral, PAG: sustancia gris periacueductal, BNST: núcleo del lecho de la estricta terminal, DRN: núcleo del dorsal raquí, RMTg: núcleo tegmental mesopontino rostro medial, LHT: hipotálamo lateral, VP: pálido ventral, MSNs : neuronas espinosas medias del NAcc, PV: parvalbúmina) (modificada de Morales & Margolis, 2017).

### ***Interacción de las poblaciones neuronales en el ATV***

La liberación de DA en el ATV es compleja e involucra mecanismos de regulación mediados por el glutamato, a través de receptores NMDA constitutivamente activos y de GABA a través de receptores GABA<sub>A</sub> (Lobb y cols., 2011).

En condiciones basales, las neuronas dopaminérgicas del ATV liberan dopamina de manera tónica, mientras que las células GABAérgicas están ejerciendo un freno sobre las neuronas dopaminérgicas y regulando la liberación tónica de DA (Lobb y cols., 2011). La actividad de las neuronas dopaminérgicas que surgen en el ATV es regulada por neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas de esa región cerebral. Por ello, se incluyen las generalidades de esos neurotransmisores.

### **GABA**

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA, por sus siglas en inglés) es el neurotransmisor inhibitorio por excelencia en el cerebro adulto, tanto de vertebrados como de invertebrados. En el sistema nervioso central (SNC) de vertebrados, aproximadamente el 30% de todas las sinapsis expresan GABA (Bohlen & Dermietzel, 2002).

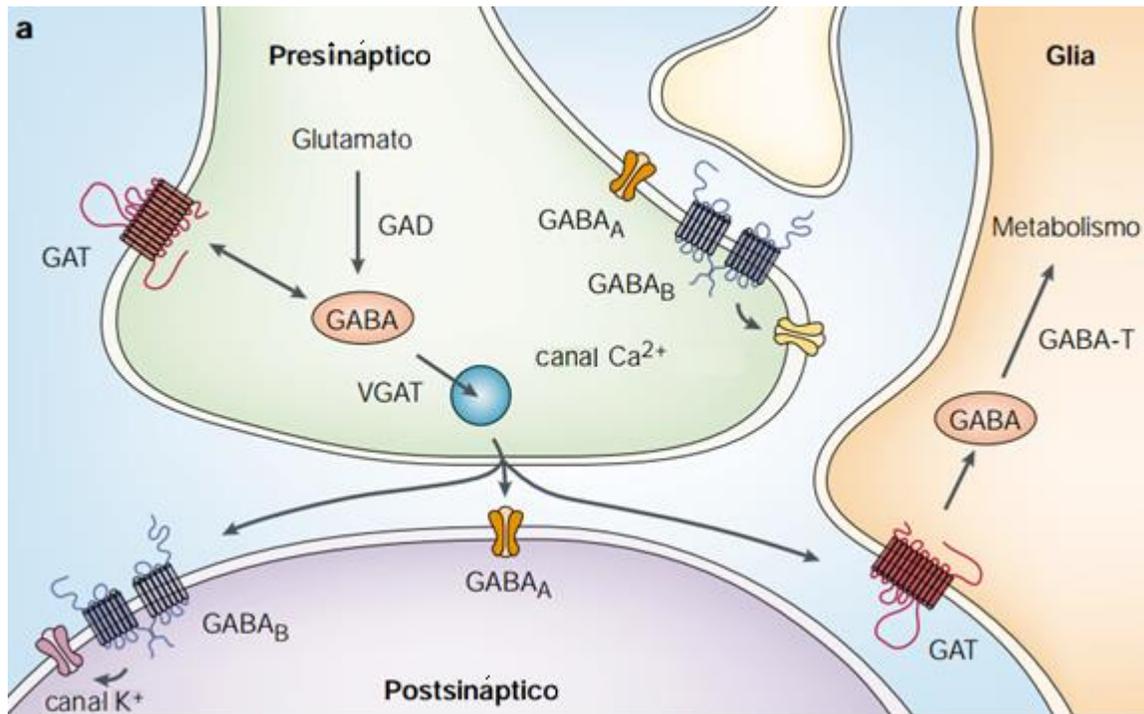
La síntesis de GABA se lleva a cabo casi exclusivamente a partir de glutamato, aunque también pueden servir de precursores el piruvato y la glutamina (Purves y cols., 2012; Bohlen & Dermietzel, 2002). El paso limitante en la biosíntesis de GABA es la descarboxilación del ácido L-glutámico, que es catalizada por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD, por sus siglas en inglés) (Martin & Rinvall, 1993). La GAD se encarga de convertir el glutamato en GABA (Bohlen & Dermietzel, 2002). Esta reacción requiere de fosfato de piridoxal como cofactor.

Se han identificado dos isoformas de la GAD, la *GAD65* y la *GAD67* (Peng y cols., 1993; Purves y cols., 2012) que son codificadas por dos genes distintos (Erlander y cols., 1991) y se transcriben únicamente en células positivas a GABA. Algunas neuronas GABAérgicas expresan una sola de las isoformas, mientras que otras expresan una mezcla de GAD 65 y GAD 67 (Esclapez y cols., 1993). Cada isoforma difiere en afinidad por el cofactor fosfato de piridoxal así como en su localización subcelular. GAD 65 se encuentra mayormente como apoenzima, es decir, disociada de su cofactor, mientras que GAD 67 se encuentra asociada a su cofactor, por lo que se considera como la forma activa de la enzima (Martin & Rimvall, 1993). Si bien ambas isoformas se localizan en cuerpos neuronales, dendritas y axones, GAD 65 se observa mayormente en terminales nerviosas y GAD 67 en cuerpos neuronales y dendritas (Kaufman y cols., 1991; Esclapez y cols., 1994).

En cuanto al control transcripcional de GAD 67, se ha reportado que la región promotora del gen que codifica para esta enzima, presenta varios sitios de unión para factores de transcripción, entre los que se encuentran AP1, AP2, Hox, E-box, egr-1, NF-kB y CREB (Bowers y cols., 1998; Szabó y cols., 1996; Yin y cols., 2010), de manera que la activación de estos factores de transcripción, inducirá cambios a la alza o a la baja, en el contenido del RNAm que codifica para la GAD 67 (Bowers y cols., 1998; Szabó y cols., 1996; Hanno-Iijima y cols., 2015).

Existen antecedentes que muestran que el RNAm de la GAD 67 es susceptible a sufrir modificaciones en respuesta al incremento o disminución de la actividad neuronal (Bowers y cols., 1998; Cullinan y cols., 1995; Litwak y cols., 1990; Hanno-Iijima y cols., 2015). Se ha establecido que las proteínas de GAD sufren modificaciones postraduccionales, entre ellas la fosforilación a través de la PKA (Wei y cols., 2004). Esta fosforilación es reversible y constituye un punto de regulación para las vías de señalización que regulan el crecimiento celular, la diferenciación, la migración y la apoptosis en eucariontes (de Graauw y cols., 2006). La actividad neuronal promueve la expresión de BDNF y la GAD se regula a la alza por acción del BDNF (Matsumoto y cols., 2006). En la figura 5 se

resumen los componentes que forman parte de la biosíntesis y degradación de GABA.



**Figura 5:** Componentes de la síntesis y transporte de GABA en las sinapsis. GABA es sintetizado a partir de glutamato por acción de la GAD, y es ingresado al interior de las vesículas por el transportador vesicular VGAT. Los receptores de GABA están localizados en la pre- y la post-sinápsis. La recaptura de GABA ocurre a través de la acción del transportador membranal de GABA (GAT). Finalmente, GABA es metabolizado por una reacción de transaminación, que es catalizada por la enzima GABA transaminasa (GABA-T). El metabolismo de GABA ocurre tanto en neuronas como en células de glía (Modificado de Owens, 2002).

## GLUTAMATO

El glutamato es el neurotransmisor excitador más abundante en el SNC de los mamíferos; casi todas las neuronas excitatorias del sistema nervioso central son de naturaleza glutamatérgica y se estima que más del 50% de todas las sinapsis del encéfalo liberan glutamato (Purves y cols., 2012).

La barrera hematoencefálica posee una permeabilidad muy baja al glutamato, por ello, todo el glutamato en el cerebro se sintetiza mediante la transaminación de  $\alpha$ -cetoglutarato, tanto en neuronas como en glía. En las células gliales, el glutamato es transformado en glutamina, que constituye el principal precursor del glutamato. La glutamina ingresa a las neuronas y, en la terminal sináptica, es convertida en glutamato por acción de la glutaminasa. El glutamato es ingresado a las vesículas sinápticas por acción de los transportadores vesiculares de glutamato (VGluT's) (Purves y cols., 2012). Hasta el momento se han identificado tres isoformas de VGluT's en el SNC: el VGluT1, el VGluT2 y el VGluT3. El VGluT1 y el VGluT2 se expresan únicamente en neuronas glutamatérgicas (Takamori y cols., 2000, 2001), por ello se han considerado biomarcadores moleculares de estas neuronas, mientras que el VGluT3 ha sido encontrado en neuronas que utilizan otros neurotransmisores además de glutamato. Entre ellas podemos mencionar a las neuronas GABAérgicas, interneuronas colinérgicas, neuronas monoaminérgicas y células de glía (Gras y cols., 2002; Fremeau y cols., 2002; Schäfer y cols., 2002).

Además de los receptores, los transportadores membranales de glutamato o transportadores vesiculares (VGluT1-3) juegan un papel clave en la regulación de las concentraciones de glutamato extracelular (Hinoi y cols., 2005). Los VGluT's son necesarios para el transporte de glutamato al interior de las vesículas de secreción y por lo tanto, pueden considerarse indicadores indirectos de la actividad glutamatérgica (Erickson y cols., 2006).

En algunas enfermedades asociadas con alteraciones en la transmisión glutamatérgica, se ha determinado que cuando la alteración involucra incrementos en la transmisión glutamatérgica éstos van acompañados de un aumento en el contenido del RNAm de VGluT2, mientras que se presenta una disminución en su expresión cuando la alteración involucra una disminución de la actividad neuronal glutamatérgica (Scott y cols., 2008; Uezato y cols., 2009; Glazova y cols., 2015). Estos antecedentes ponen de manifiesto que el RNAm de VGluT2 es sensible a cambios en la transmisión glutamatérgica.

## JUSTIFICACIÓN

---

La cópula es una conducta recompensante que activa al MLD, aumentando la liberación de DA en el NAcc. La actividad del MLD está regulada por aferencias GABAérgicas y glutamatérgicas en el ATV. Durante la cópula (estímulo recompensante) la actividad de las neuronas GABAérgicas se inhibe y la de las glutamatérgicas aumenta. No se sabe si estos cambios se mantienen durante el proceso de cópula hasta la saciedad, por lo que es importante determinar si la actividad de estos dos tipos de neuronas se modifica por la cópula intensa.

Por otro lado, los tratamientos farmacológicos que revierten la inhibición sexual característica de la saciedad interactúan directa o indirectamente con la transmisión dopaminérgica para inducir la expresión de la cópula. Sería importante determinar si el aumento en la liberación de DA en el NAcc es capaz de revertir la saciedad sexual.

## HIPÓTESIS

---

1. La activación intensa del circuito mesolímbico dopaminérgico que tiene lugar durante una sesión de cópula hasta la saciedad producirá un aumento en la actividad de las neuronas glutamatérgicas y una disminución en la actividad de las neuronas GABAérgicas del ATV, que se reflejarán en cambios en el contenido de los RNA mensajeros (RNAm) del transportador vesicular de glutamato VGLuT2 y de una de las enzimas que participan en la síntesis de GABA, la glutamato descarboxilasa isoforma 67 (GAD 67).
2. El aumento en las concentraciones de DA en el NAcc, inducido por la administración de orexina A en el ATV, revertirá la inhibición sexual de ratas sexualmente exhaustas.

## **OBJETIVOS**

---

### **Objetivos generales**

1. Analizar si la cópula hasta la saciedad produce cambios en la expresión del RNAm de la enzima GAD 67 y del RNAm del transportador vesicular de glutamato VGluT2.
2. Establecer si la inducción farmacológica de un incremento en la liberación de DA en el NAcc revierte la saciedad sexual.

### **Objetivos particulares**

1. Determinar si hay diferencias en los niveles de RNAm del transportador vesicular de glutamato tipo 2 (VGluT2) en el ATV entre ratas macho que no copulan, que eyaculan una vez y que copulan hasta la saciedad.
2. Determinar si hay diferencias en los niveles del RNAm de la enzima GAD67 en el ATV entre ratas macho que no copulan, que eyaculan una vez y que copulan hasta la saciedad.
3. Establecer si un aumento en la liberación de DA en NAcc, inducido por la administración intra-ATV de orexina A, revierte la inhibición sexual de ratas sexualmente saciadas.

## METODOLOGÍA

---

### **Animales**

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar de 11 semanas de edad, que fueron alojadas en el bioterio en condiciones de temperatura controlada (22-24°C), bajo un ciclo de luz-oscuridad invertido (12/12 hrs, la fase de oscuridad inicia a las 10:00 am) y con acceso a alimento y agua *ad libitum*. Se utilizaron machos sexualmente expertos (animales que eyacularon en un tiempo menor a 15 minutos en al menos 3 de 5 sesiones de conducta sexual) y hembras sexualmente receptivas como estímulo sexual. La receptividad se indujo por la administración secuencial de 12 µg/rata de benzoato de estradiol seguida de 6 mg/rata de progesterona 24 y 4 hrs previas a la prueba de conducta sexual, respectivamente. Las hembras estuvieron sexualmente receptivas 4 hrs después de la administración de progesterona.

### **Registro de la conducta sexual**

La conducta sexual fue evaluada en la fase oscura del ciclo, que corresponde a la etapa activa de los roedores. Esta evaluación, se realizó en un cuarto iluminado con luz roja. Los machos se colocaron individualmente en una arena cilíndrica con una cama de aserrín y se les permitió un periodo de adaptación de 5 min antes de introducir a una hembra sexualmente receptiva y registrar su actividad sexual.

### **Paradigma de Saciedad Sexual**

El paradigma de saciedad sexual utilizado en este proyecto consistió en permitir a las ratas macho sexualmente expertas copular *ad libitum* con una misma hembra receptiva hasta alcanzar el criterio de saciedad sexual, es decir, hasta que transcurren 90 minutos desde la última eyaculación sin que se presente otra eyaculación.

### **Actividad ambulatoria**

Al concluir el registro de la conducta sexual de los machos se evaluó su actividad locomotora espontánea a fin de descartar posibles efectos inespecíficos de los fármacos que pudieran haber interferido con la ejecución de la conducta sexual. Esta conducta se evaluó durante 5 minutos utilizando un actímetro (Marca Panlab). El actímetro se limpió con una solución de cloruro de benzalconio al 10% entre cada una de las determinaciones para eliminar rastros de olores.

### **Cirugía estereotáxica**

Para la administración intracerebral se implantaron bilateralmente cánulas guía, dirigidas al ATV, por medio de cirugía estereotáxica. Los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina (100 mg/kg, i.p.) y xilazina (10 mg/kg, i.p.) y se montaron en un aparato estereotáxico. Se hizo una incisión en la piel de la cabeza para exponer el cráneo, se localizaron las coordenadas correspondientes al ATV [AP: -5.2 mm desde bregma, L:  $\pm 1.0$  mm y DV: 8.6 mm] (Paxinos & Watson, 2009) y se hicieron los trépanos a través de los cuales se introdujeron las cánulas guía, de 1 cm de longitud y 27G, que fueron fijadas al cráneo con acrílico dental y un tornillo que sirvió como anclaje. Después de la cirugía, los animales se colocaron en cajas individuales y se les permitió un periodo de recuperación de una semana antes de realizar el experimento. Después del segundo día de recuperación, los animales se manipularon todos los días para habituarlos y poder administrar el fármaco sin anestésarlos.

### **Administración de tratamientos intra-ATV**

La administración intra-ATV de orexina A, disuelta en agua milli Q a la cual se le adicionó 1% de ácido acético o su vehículo (agua milli Q al 1% ácido acético) se realizó por medio de cánulas de inyección cuya longitud alcanzaba el ATV [DV: 8.6 mm], acopladas a jeringas Hamilton de 10  $\mu$ l por medio de un catéter flexible. El fármaco se administró bilateralmente con la ayuda de una bomba de infusión (marca Kd Scientific), a una velocidad constante de 0.5  $\mu$ l/ 3 min. Al término de la administración, las cánulas de inyección se dejaron 1 minuto adicional antes de retirarlas para asegurar que el contenido del fármaco terminara de difundir

completamente. Transcurridos 5 minutos, los animales se sometieron a la prueba de conducta sexual.

### **Verificación del sitio de implantación**

Una vez que concluyó el registro de la conducta sexual, los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico por rata vía intraperitoneal y se perfundieron por vía intracardíaca con 50 ml de solución isotónica de NaCl (0.9%), seguidos de 150 ml de formaldehído al 10%. Los cerebros se disectaron y post-fijaron hasta 24 horas antes de cortarlos. En los cerebros congelados se hicieron cortes coronales de 40  $\mu\text{m}$  en la región correspondiente al ATV, con la ayuda de un crióstato. Las rebanadas se montaron en portaobjetos que se utilizaron como negativo y con ayuda de un escáner se obtuvieron imágenes en las que se verificó el sitio de implantación.

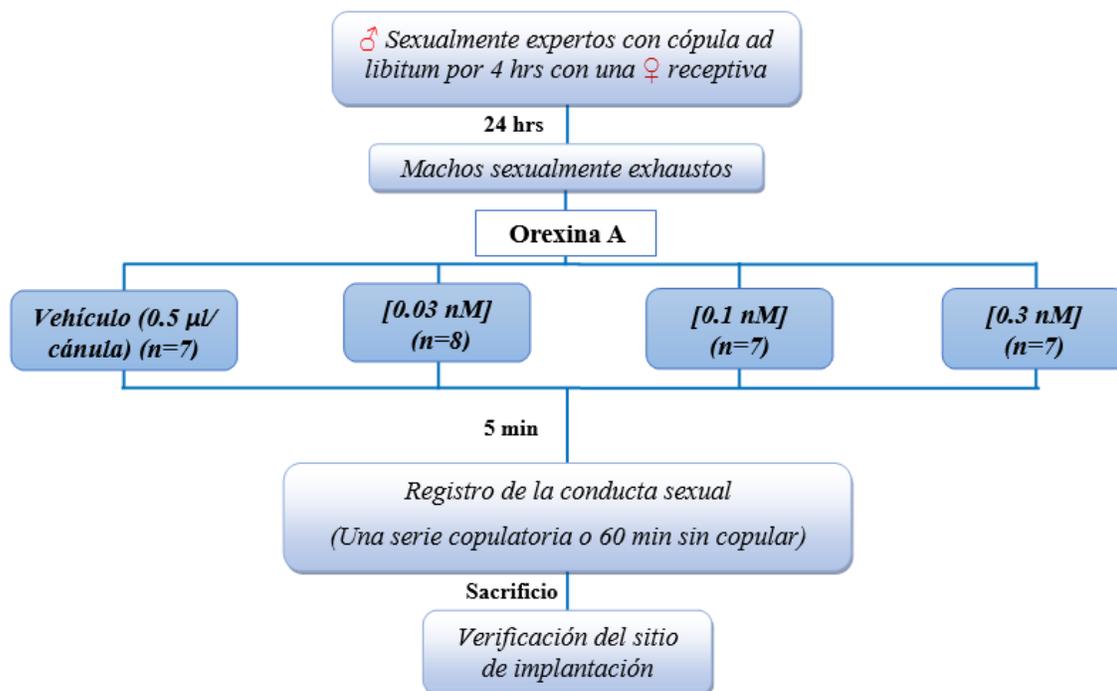
### **Fármacos**

El benzoato de estradiol y la progesterona, así como la orexina A se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Las hormonas se disolvieron en aceite de maíz y se administraron por vía s.c. La orexina A se disolvió en agua milli Q con 1% de ácido acético y se administró por vía intracerebral.

## Efecto de la administración intra-ATV de diferentes concentraciones de orexina A en ratas macho sexualmente saciadas

### Diseño experimental

Se utilizaron 4 grupos independientes de ratas macho sexualmente saciadas (n=7-8, cada uno) a las cuales se les permitió copular hasta la saciedad y a las 24 horas post-saciedad se les administraron diferentes concentraciones de orexina A o su vehículo por vía intra-ATV. Posteriormente se registró su actividad sexual hasta que completaran una serie copulatoria o transcurrieran 60 minutos sin que presentaran actividad sexual (Figura 6).



**Figura 6:** Diseño experimental utilizado para determinar el efecto de la administración de Orexina A intra ATV en ratas macho sexualmente saciadas.

## ***Determinación de los niveles de RNAm de VGlut2 y GAD 67 en el ATV por hibridación in situ fluorescente (FISH)***

### **Obtención de tejidos**

Los animales fueron anestesiados con 0.6 ml de pentobarbital sódico por rata (ANESTESAL marca Pfizer, [6.3 g/100 ml]) y se les realizó una perfusión transcardíaca empleando 50 ml de buffer de fosfatos (PBS) 1x, pH=7.4 [PBS 10X= 1.36M NaCl, 14.7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 80mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 26.8 mM KCl, H<sub>2</sub>O-ISH] que contenía 15,000 UI/lt de heparina (Inhepar, solución inyectable) y 150 ml de paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS 1X para fijar el tejido. Al término de la perfusión los cerebros fueron disectados y post fijados individualmente en una solución de PFA al 4% en PBS 0.01 M pH=7.4 durante 24 hrs a 4°C. Para criopreservar el tejido, los cerebros fueron colocados en una solución de sacarosa al 25% disuelta en PBS por 24 hrs a 4°C o hasta que los cerebros permanecieran en el fondo de los viales. Los tejidos se congelaron con hielo seco pulverizado y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento en un ultracongelador (marca Thermo Scientific modelo 956).

### **Procesamiento de los cerebros**

Se realizaron cortes coronales de 20 µm de grosor por medio de un crióstato (marca Microm, modelo HM525) a lo largo del ATV en dirección rostral-caudal (Bregma -5.52 a -6.48 mm; Paxinos & Watson 2009). Los tejidos fueron colectados en PBS 1x, pH=7.4 en 6 series, cada 3 cortes (alternando una rebanada sí y una no). Los cortes se montaron en laminillas cargadas electrostáticamente (marca Fisher Scientific, Cat. 125-550-15) con ayuda de un pincel fino previamente tratado con inhibidor de RNAsas (RNAsa Zap, marca Ambion) y PBS 1x. Los tejidos se colocaron en una estufa con temperatura controlada (marca Hinotek, Modelo DZF-6030A) a 42°C, toda la noche para optimizar la adherencia del tejido a la laminilla y eliminar las burbujas que hubieran quedado entre el tejido y el portaobjetos. Finalmente, los tejidos se almacenaron en un ultracongelador a -80°C hasta su uso.

### **Linearización y purificación de los plásmidos que contenían la secuencia para VGlut2 o GAD 67**

Para las hibridaciones fluorescentes se utilizó un plásmido que contiene 879 pb de la secuencia del cDNA que codifica para VGlut2 (número de registro en el Gene Bank NM\_053427). Este fragmento es complementario a las bases 522-1400 del RNAm de VGlut2 (Hrabovsky y cols., 2004; secuencia en la sección de anexos). El plásmido empleado para detectar GAD 67 contiene un fragmento de 535 pb (número de registro en el Gene Bank NM\_017007.1) complementario a las bases 232-769 del cDNA de GAD 67 (Petersen y cols., 2002; secuencia en la sección de anexos). Ambos plásmidos se linearizaron con enzimas de restricción de New England BioLabs y se purificaron previo a la transcripción in vitro de la sonda con rUTP-digoxigenina (UTP-dig). Se empleó 1 unidad de enzima de Sal I/  $\mu\text{g}$  de plásmido VGlut2 por linearizar y 1 unidad de Sac I/  $\mu\text{g}$  de plásmido GAD 67 por linearizar.

En ambos casos se linearizaron 30  $\mu\text{g}$  de cada plásmido con la enzima de restricción mencionada, empleando un horno seco con temperatura controlada (marca Hinotek, Modelo DZF-6030A) por un tiempo de incubación mínimo de 4 horas a 37°C. Como punto de referencia se consideró la constante que establece que 1 unidad de enzima es capaz de digerir 1  $\mu\text{g}$  de un plásmido conocido a 37°C en una hora.

Las digestiones se hicieron como se indica en la tabla siguiente:

<b>Sonda</b>	<b>Enzima de restricción</b>	<b>Cantidad de plásmido</b>	<b>Cantidad de Buffer</b>	<b>Tipo de Buffer</b>	<b>Cantidad de H<sub>2</sub>O - ISH</b>	<b>Unidades de enzima</b>	<b>Volumen Total</b>
<b>VGlut2</b>	Sal I	30 $\mu\text{g}$	10 $\mu\text{l}$	NE 3.1 10x	51.7 $\mu\text{l}$	30 U	100 $\mu\text{l}$
<b>GAD 67</b>	Sac I	30 $\mu\text{g}$	10 $\mu\text{l}$	NE 2.1 10x	51.7 $\mu\text{l}$	30 U	100 $\mu\text{l}$

**Tabla 1:** Digestión de los plásmidos utilizados en las FISH de VGlut2 y GAD 67

Una vez transcurrido el tiempo de linearización, se transfirieron los tubos eppendorf a hielo frappé con el fin de detener la reacción. Para verificar si la linearización había sido total, se corrió un gel de agarosa al 1% - TBE 1x,

empleando 1/10 del volumen de la reacción y se tiñó con bromuro de etidio (300 µl del Stock [10 mg/ml] / 250 ml agua). Una vez determinada la linearización total del sustrato, se procedió al paso de purificación del DNA.

### **Purificación del DNA**

La purificación del DNA linearizado se llevó a cabo mediante extracción 1:1 (v/v) de fenol: cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). La mezcla del plásmido: fenol se agitó en el vórtex durante 60 segundos; posteriormente se adicionó el cloroformo-alcohol isoamílico y se repitió el paso de agitación durante 60 segundos. Se realizó un paso de centrifugación de 4 min a 13,500 rpm's a temperatura ambiente (TA) para recuperar en un tubo estéril la muestra contenida en la fase acuosa; se adicionó un volumen más de agua a la fase orgánica, se agitó por 60 segundos en el vórtex y se centrifugó a 13,500 rpm por 4 minutos a TA. Se recuperó la fase acuosa adicionándola al tubo que contenía la fase acuosa del paso anterior y se hizo una extracción adicional con un volumen (1:1) de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) agitando 60 segundos en el vórtex o hasta que la solución se pusiera lechosa. Se centrifugó a 13,500 rpm a TA para separar la fase acuosa de la fase orgánica y se recuperó la fase acuosa en un tubo estéril de 1.5 ml para precipitar la muestra con 1/10 de NaCl 5M más dos volúmenes de etanol absoluto frío durante toda la noche (O/N) a -80°C. La mezcla se centrifugó a 13,500 rpm durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante de etanol se decantó en un tubo limpio rotulado como SN100 cuidando de no desprender la pastilla que contenía al plásmido linearizado; se adicionaron 500 µl de etanol al 70%- H<sub>2</sub>O-ISH para retirar el exceso de NaCl mediante un paso de centrifugación a 13,500 rpm durante 8 minutos a 4°C. Se retiró el alcohol al 70% y se recuperó en un tubo limpio rotulado como SN70. En este paso fue relevante tener cuidado de no aspirar con la punta de la pipeta, la pastilla que contenía el plásmido, además de retirar la mayor cantidad posible de alcohol, ya que éste puede potencialmente inhibir a la RNA polimerasa que se emplea en el siguiente paso (transcripción in vitro). La pastilla con el plásmido se secó de 10 a 15 minutos a TA; una vez seca, se resuspendió en H<sub>2</sub>O-ISH estéril, en un volumen que permitiera obtener una concentración final

aproximada de 1 µg/µl. Nuevamente se corrió un gel de agarosa al 1%-TBE 1x para confirmar la calidad y concentración del DNA purificado.

### ***Transcripción in vitro. Marcaje de sondas de RNA complementarias al RNAm de VGluT2 y GAD 67***

Para las FISH se utilizaron sondas que fueron marcadas con digoxigenina-11-α-UTP (dig-UTP). El marcado de sondas se realizó empleando 1.5 µg del plásmido linearizado de VGluT2 o GAD 67 desnaturalizado durante 5 minutos en agua en ebullición. Transcurrido ese tiempo, los tubos que contenían a los plásmidos (uno por sonda) se colocaron en hielo, a cada tubo se le adicionó lo siguiente: 2 µl *buffer* de transcripción 10X, 1 µl de dithiothreitol (DTT) 0.1 M, 3 µl de una mezcla de nucleótidos A, G, C 10 mM, 2µl de rUTP 1mM, 2 µl de digoxigenina 11-α-UTP 10 mM y 0.5 µl de inhibidor de RNAsas (40 U/µl). Se agregaron 30 unidades de la enzima T3 RNA polimerasa (6 µl, 5000 U/ml, marca Roche) y H<sub>2</sub>O-ISH para obtener un volumen final de 20 µl. El tubo con la mezcla de reacción se colocó en un horno con temperatura controlada a 37°C durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo, se adicionaron 30 unidades más de T3 RNA polimerasa (6 µl) a cada uno de los tubos y se incubó de nuevo durante 1 hora a 37°C. Transcurrido este periodo se adicionaron 10 unidades de DNAsa I (10 U/µl), 20 unidades de inhibidor de RNAsas (40 U/µl), 1 µl de RNA de transferencia (RNAt; 10 mg/ml) y se incubó a 37°C por 45 minutos. Para detener la reacción de transcripción se adicionó H<sub>2</sub>O milli Q hasta llegar a un volumen final de 100 µl.

Los transcritos marcados con dig-UTP se precipitaron con 1/25 del volumen de NaCl 5 M + 3 volúmenes de etanol absoluto frío durante 12 horas a -20°C. Posteriormente se centrifugaron durante 30 minutos a 13,500 rpm´s a 4°C, se les retiró el sobrenadante y se lavaron una vez en etanol al 70% (vol:vol en H<sub>2</sub>O); la pastilla que contenía cada uno de los transcritos marcados se dejó secar por 5 minutos a TA y finalmente se resuspendió en 100 µl de 0.1% dodecil sulfato de sodio (SDS)- H<sub>2</sub>O-ISH. Los transcritos se almacenaron a -80°C hasta su uso.

## Tratamiento de pre-hibridación para tejidos perfundidos

La preparación de los tejidos perfundidos para hibridación se llevó a cabo en cajas *coplin* en las que se realizaron los siguientes tratamientos, todos con agitación continua:

- 1 lavado en PBS 1X durante 3 minutos a TA
- 1 lavado con tritón X-100 al 0.3%- PBS 1X en H<sub>2</sub>O-ISH durante 15 minutos a TA
- 1 lavado en PBS 1X en H<sub>2</sub>O-ISH durante 3 minutos a TA
- Incubación con proteasa K (1 µg/ml) por 30 minutos a 37°C
- Fijación adicional en paraformaldehído al 4% - PBS 1X durante 5 minutos a TA
- 2 lavados en PBS 1X durante 3 minutos cada uno a TA
- Acetilación con anhídrido acético al 0.25% - trietanolamina 0.1M durante 10 minutos a TA. La solución se preparó al momento debido a que el anhídrido acético se ioniza con el agua; se utiliza trietanolamina (TEA) para mantenerlo en su forma original, sin embargo, ésta última pierde su propiedad protectora al oxidarse con la luz)
- 1 lavado en formamida al 50% en SSC 2X H<sub>2</sub>O-ISH en un rango de 10 minutos a 1 hora, a 37°C. Las laminillas permanecieron en esta solución hasta que les colocó la mezcla de hibridación.

## Buffer de hibridación

Para preparar 1 ml de buffer de hibridación se adicionaron los siguientes reactivos en el orden que se indica:

Reactivo	Cantidad
<i>Dextran Sulfato</i>	0.1 g
<i>SSC 20X</i>	100 $\mu$ l
<i>Tris – HCl 1 M pH=8.0</i>	250 $\mu$ l
<i>Agua</i>	55 $\mu$ l
<i>Denhardt's 100XC</i>	10 $\mu$ l
<i>DTT 1 M</i>	10 $\mu$ l
<i>DNAss (desnaturalizado 5 min a 65 °C)</i>	25 $\mu$ l
<i>Formamida</i>	500 $\mu$ l
<i>SDS 10%</i>	50 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>1000 <math>\mu</math>l</b>

**Tabla 2:** Composición del buffer de hibridación

\*\* DNAss: DNA de esperma de salmón

## Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) para VGluT2 y GAD 67

Las FISH para VGluT2 y GAD 67 se hicieron en 6 cortes representativos/ animal/ grupo experimental (n=3) por sonda, con Bregma distinto, en dirección rostral-caudal del ATV.

Cada laminilla se hibridó con 60  $\mu$ l de mezcla de hibridación que contuvo: 3  $\mu$ l de la sonda marcada con digoxigenina (VGluT2 o GAD 67), 0.75  $\mu$ l de DTT 1 M y 56.25  $\mu$ l del buffer de hibridación (Tabla 2). Los transcritos fueron desnaturalizados por 5 minutos a 65°C y colocados inmediatamente en hielo. La mezcla de hibridación se incubó a la temperatura de hibridación durante 30 minutos y posteriormente se colocó sobre los tejidos de cada una de las laminillas; con la ayuda de una pinza, se cubrió con un parafilm del tamaño necesario para cubrir los cortes. El parafilm permitió que la mezcla se distribuyera de manera uniforme en todos los cortes. Las laminillas se colocaron dentro de cámaras húmedas que

contuvieron una cama de papel absorbente en la tapa, cubierta con una solución de SSC 1X/ formamida 1:1 (vol:vol). Las cámaras húmedas se sellaron cuidadosamente con plástico adherible y se colocaron en posición vertical en un horno a 54°C durante toda la noche.

### **Lavados post-hibridación**

Las cajas húmedas que contenían las laminillas hibridadas se sacaron del horno, se retiró el parafilm de cada laminilla y se colocaron en una solución de buffer SSC 1X a TA para eliminar el exceso de mezcla de hibridación. Posteriormente se colocaron en las rejillas de las cajas coplin para realizar una serie de lavados con agitación continua y diferentes condiciones de astringencia y temperatura con el fin de eliminar el pegado inespecífico de la sonda:

- 1 lavado en buffer SSC 1X por 15 minutos a TA
- 1 lavado en buffer 1X sin RNAsa durante 5 minutos a 37°C (29.22 g de NaCl, 10 ml de Tris HCl 1 M pH=8.0, 2 ml de EDTA 0.5 M pH=8.0, aforado a 1 litro con H<sub>2</sub>O-ISH).
- 1 lavado con RNAsa A (50 µg/ml) disuelta en buffer de RNAsa 1X durante 1 hora a 37°C
- 1 lavado con buffer SSC 1X durante 15 minutos (en este paso se incrementa la temperatura del baño de 37°C a 65°C)
- 1 lavado con buffer SSC 0.5X durante 15 minutos a 65°C
- 2 lavados con buffer SSC 0.1X durante 30 minutos cada uno a 65°C
- 1 lavado con buffer SSC 0.1X durante 5 minutos a TA para retirar los residuos eliminados por el buffer a 65°C del paso anterior
- Se sustituyó el buffer del lavado a TA por la solución de bloqueo [(SSC 2X, 2% de albúmina bovina grado cultivo celular (BSA marca sigma Cat. A-8022), 0.05% de Tritón X-100 y H<sub>2</sub>O milli Q hasta el aforo] y se incubó a TA o 22°C durante 5 horas en agitación moderada.

## **Incubación con el antidigoxigenina-peroxidasa**

Después de la solución de bloqueo, se incubó con el anticuerpo anti dig-peroxidasa (Ab POD) 1:50, diluido en Tritón 0.3%, BSA 1%, Buffer A (0.1M Tris HCl pH=7.6, NaCl 0.15 M en H<sub>2</sub>O-ISH). Cada laminilla contuvo:

60 µl de la mezcla de incubación que contenía el anticuerpo 1:50 y solución de bloqueo SSC 2X, 2% BSA, 0.05% de Tritón X-100 en H<sub>2</sub>O milli Q. La mezcla se colocó, con ayuda de unas pinzas y los tejidos se cubrieron con parafilm, evitando la formación de burbujas. Las laminillas se colocaron en una cámara húmeda (preparada sólo con agua en papel absorbente colocado en la parte superior de la tapa), de tal forma que las laminillas quedaran en forma horizontal, y se dejaron incubar 48 hrs a 4°C.

## **Revelado de señal digoxigenina con Tiramida-DMSO-Alexa 488**

1. Las laminillas y las soluciones stock (PBS 10X para inmuno y PBT, ver anexo) almacenados a 4°C se atemperaron durante 30 minutos antes de iniciar el protocolo.
2. El dimetil sulfóxido (DMSO) almacenado a -20°C proveniente del kit TSA se atemperó 1 hr antes de comenzar
3. Se retiró la cubierta de parafilm con buffer PB 0.01 M pH=7.4 a TA.
4. Se hicieron 4 lavados con PBT durante 15-20 minutos cada uno a TA con agitación moderada.
5. Se colocaron 60 µl (60 µl=mismo volumen que usamos para hibridar) de la mezcla de revelado (marca Invitrogen, kit Cat. MP20912 # 2) sobre los tejidos de cada laminilla y se cubrieron con papel parafilm de manera similar al paso de la incubación con el anticuerpo. La mezcla se dejó actuar por un periodo de 15 minutos (30 min como máximo).

Cada 303  $\mu$ l de la mezcla de revelado fueron suficientes para revelar la señal de 6 cortes por portaobjeto y un total de 7 laminillas. La mezcla contuvo \*:

Reactivo	Contenido en la mezcla
<i>Buffer de amplificación (vial 1 del kit)</i>	297 $\mu$ l
<i>Vial 3</i>	3 $\mu$ l
<i>Tyramida-DMSO</i>	3 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>303 <math>\mu</math>l</b>

**Tabla 3:** Composición de la mezcla de revelado para obtener la señal de la digoxigenina.

\* Ver composición de las soluciones en el apartado de anexo

1. Se retiró la cubierta de parafilm y el exceso de mezcla de revelado con buffer PB 0.01 M pH=7.4 a TA.
2. Se hicieron 3 lavados con buffer PBT\* durante 15-20 minutos cada uno a TA con agitación moderada.
3. Se realizó 1 lavado más con buffer PB 0.01 M pH=7.4 a TA por 15-20 minutos.
4. Por último, las laminillas se montaron con Antifade reagent (marca Molecular Probes, Cat. P7481).
5. Las laminillas se dejaron secar, se sellaron con barniz de uñas, se cubrieron de la luz y se observaron al microscopio. Después del análisis se almacenaron en un lugar protegido de la luz y con baja humedad.

### **Análisis de la señal emitida por el Alexa 488 en el ATV de ratas macho con o sin experiencia sexual.**

El análisis de la señal emitida por el fluorocromo Alexa 488 acoplado al Ab-dig-11 UTP-peroxidasa mediante el enlace estreptavidina-peroxidasa, se llevó a cabo mediante la cuantificación de la densidad óptica integrada (DOI) y el número de partículas fluorescentes presentes en las rebanadas de tejido que contenían al ATV.

Las imágenes fueron adquiridas empleando el objetivo 40X de un microscopio confocal de escaneo láser Zeiss 510 META, equipado con un láser de iones de argón de 488 nm (Alexa Fluor 488), acoplado a un Microscopio Axiovert 200 M. Para la adquisición de las imágenes con fluorescencia se mantuvieron constantes los siguientes parámetros: punto de referencia=1, ganancia del detector=750, desplazamiento del amplificador=-1.738, ganancia del amplificador=1, fuente láser= 25% y se mantuvieron idénticos en la adquisición de todas las imágenes de los grupos analizados para permitir la comparación de mediciones de la intensidad de la señal entre grupos.

Para realizar las mediciones de la DOI y el número de partículas en las imágenes con fluorescencia que se adquirieron de los tejidos hibridados, estas fueron transformadas a formato TIFF empleando el programa LSM Image Browser y cuantificadas con el programa Image J de uso libre (National Institute of Health). Las imágenes se convirtieron a escala de grises de 8 bits, se invirtieron y se les ajustó el umbral a 245. Se analizaron 3 animales/grupo experimental, con 6 cortes de cada uno y dos fotomicrografías de cada rebanada (ATV izquierdo y derecho) con diferente anterioridad con respecto a bregma.

La **DOI** de la señal fluorescente emitida por el Alexa 488 se midió en un área cuadrada de la imagen digital ( $\approx 226 \mu\text{m}$  por lado), que se mantuvo constante entre imágenes. Las imágenes fueron adquiridas con el microscopio confocal en la región correspondiente al ATV en cada corte (12 imágenes/animal= 36/grupo). Los resultados se expresaron como DOI, equivalente al número de partículas fluorescentes/ unidad de área en  $\mu\text{m}^2$ .

La cuantificación del **número de partículas fluorescentes** se hizo en todas las neuronas marcadas con fluorescencia que presentaron el núcleo bien definido, célula por célula, en cada una de las imágenes digitales obtenidas (en un área de  $\approx 226 \mu\text{m}$  por lado). Con el programa Image J se delimitó el contorno de la señal fluorescente en cada célula y se midió en número de partículas presentes en la región seleccionada. El número de partículas se determinó en un promedio de entre 115 y 153 células por grupo experimental para la FISH de VGluT2 y entre 91

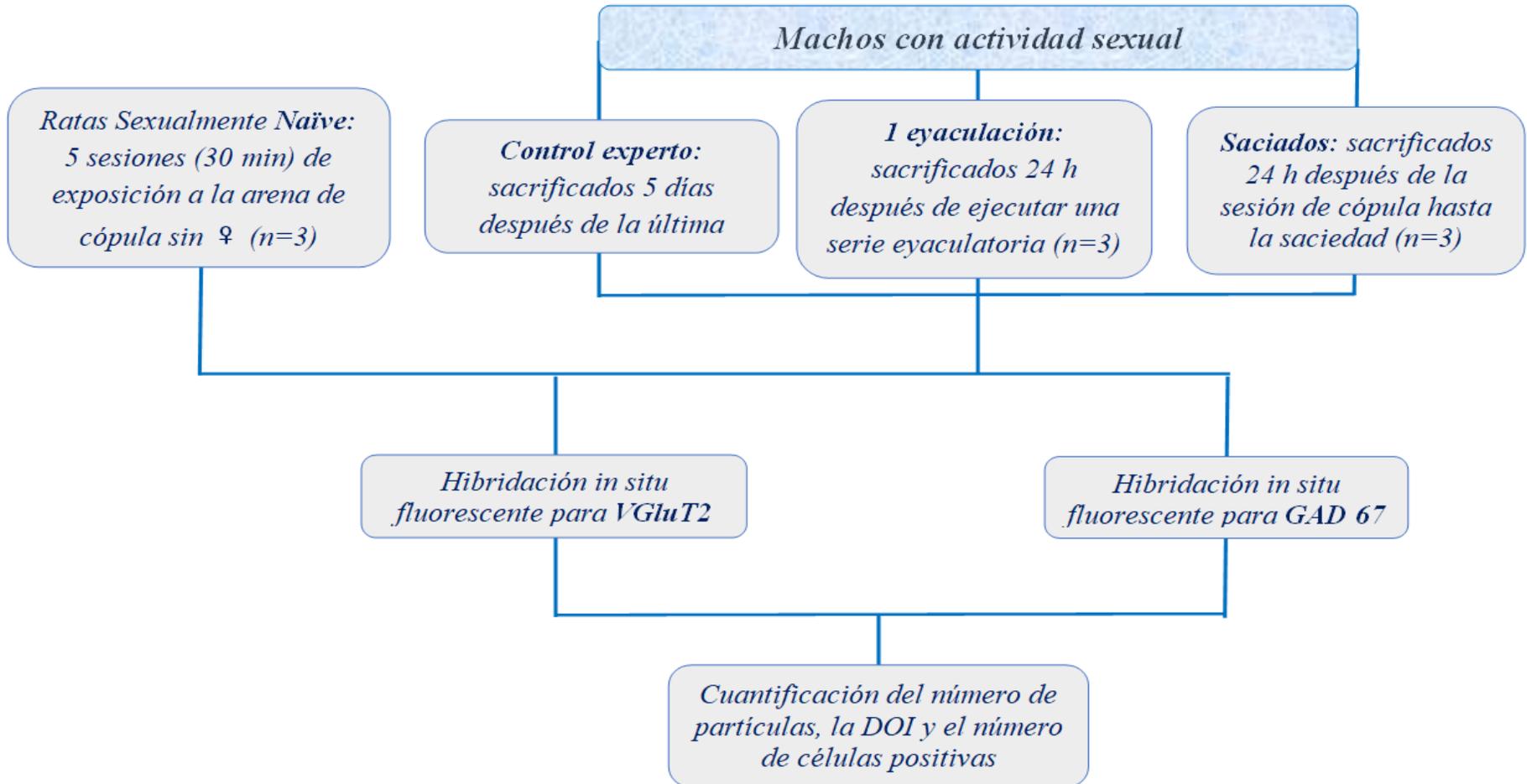
y 210 células en promedio para la sonda de GAD 67. Los resultados se expresaron como el número total de partículas fluorescentes por célula positiva.

#### ***Diseño experimental de las hibridaciones in situ fluorescentes (FISH)***

Se utilizaron 3 grupos independientes de ratas macho sexualmente expertas (n=3, cada uno) uno de los cuales ejecutó una serie eyaculatoria, otro copuló hasta la saciedad y ambos fueron sacrificados 24 horas después. El tercer grupo no tuvo actividad sexual previa al sacrificio y sirvió como control. Se obtuvieron los cerebros, de cada uno de los grupos, se realizaron cortes coronales de la región que abarca el ATV (desde -5.4 a -6.72 mm con respecto a bregma) que se hibridaron con sondas marcadas con fluorescencia para VGluT2 o para GAD 67 (figura 7).

Se incluyó también un grupo de machos sexualmente naïve, que se alojaron en el bioterio en las mismas condiciones que los animales sexualmente expertos y se sometieron a 5 sesiones, de 30 minutos cada una, de exposición a la arena en la que se realizaron las sesiones de cópula, sin la presencia de una hembra. Este grupo se comparó con el grupo de machos sexualmente expertos que no tuvo actividad sexual previa al sacrificio con el fin de determinar si había diferencias en la expresión basal de los RNAm para VGluT2 y para GAD 67, que pudieran estar asociadas a la experiencia sexual.

### Diseño experimental de las FISH de VGlut2 y GAD 67



**Figura 7:** Diseño experimental para el análisis de los cambios en el RNAm para VGlut2 y GAD 67 por hibridación in situ fluorescente (FISH).

## **Análisis estadístico**

Para determinar diferencias en los valores de la DOI, el número de partículas y el número de células positivas entre los machos sexualmente expertos, los machos que ejecutaron 1 eyaculación y los machos sexualmente saciados, se empleó un ANOVA de una vía seguida de Holm-Sidak como prueba *post hoc*. Las comparaciones pareadas entre los datos de animales sexualmente naïve y sexualmente expertos se hicieron con una prueba t no pareada.

Las diferencias en los porcentajes de machos sexualmente saciados que presentaron las diferentes respuestas de la conducta sexual (M, I, E y RC) en respuesta al tratamiento se analizaron por medio de la F de Fisher.

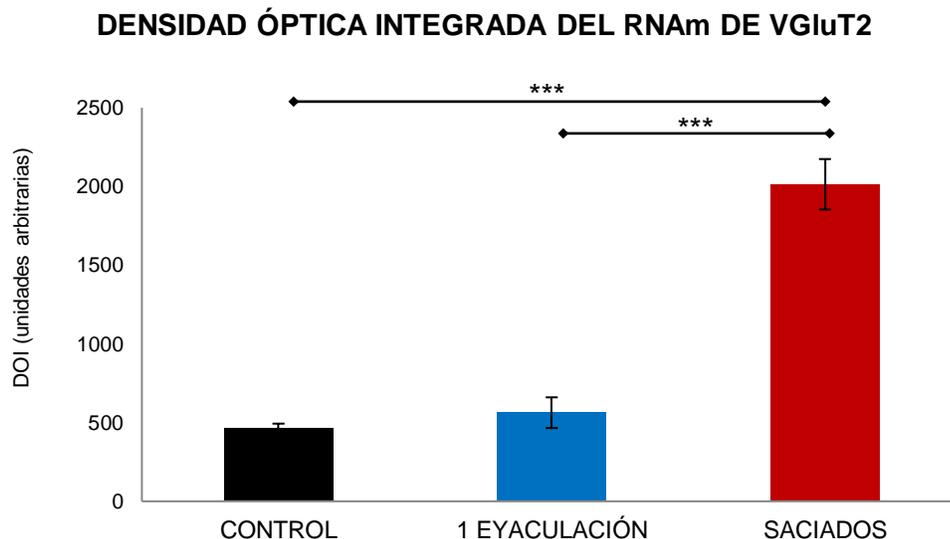
Los datos de la actividad ambulatoria espontánea se analizaron por medio de un ANOVA de Kruskal-Wallis seguido de Dunn.

Todos los análisis se realizaron empleando el programa Sigma Plot, versión 12.3. En todos los casos se consideró una diferencia estadística significativa cuando  $p \leq 0.05$ .

## RESULTADOS

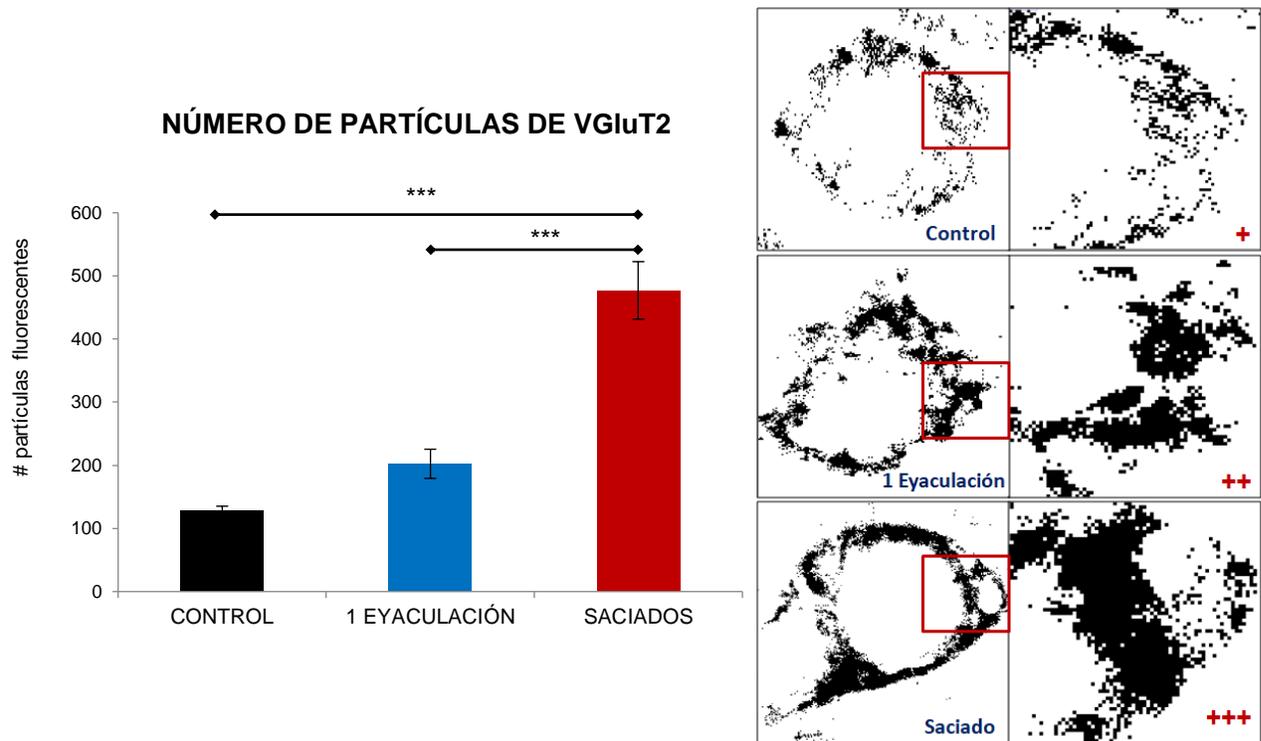
### Efecto de la condición sexual sobre los niveles de RNAm del transportador vesicular de glutamato tipo 2 (VGluT2) en el ATV de ratas macho

La figura 8 muestra la densidad óptica integrada (DOI) de la fluorescencia asociada al RNAm de VGluT2, en el ATV de ratas macho con diferente condición sexual. Se puede observar que la DOI es significativamente mayor en los machos saciados en comparación tanto con el grupo que ejecutó 1 eyaculación (ANOVA seguido de Holm-Sidak,  $p < 0.001$ ) como respecto del grupo control (ANOVA seguido de Holm-Sidak,  $p < 0.001$ ).



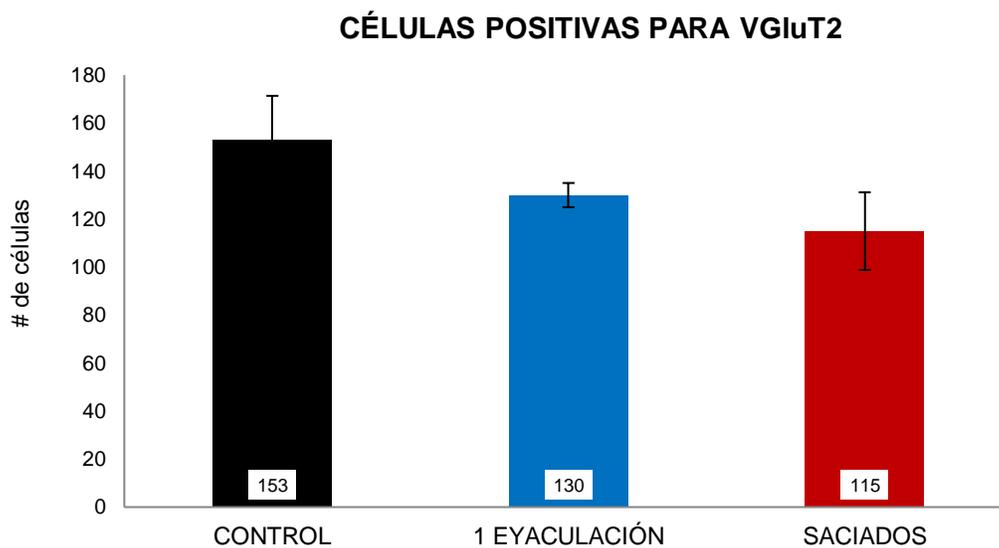
**Figura 8:** DOI del RNAm de VGluT2 de ratas macho que no tuvieron actividad sexual previa al sacrificio (control sin actividad sexual reciente), que eyacularon 1 vez (1 eyaculación) o copularon hasta la saciedad (saciados) 24h antes del sacrificio. Los resultados se presentan con el promedio  $\pm$  esm. ANOVA de una vía seguida de Holm-Sidak, \*\*\*  $p \leq 0.001$ ;  $n=3$ /grupo.

La figura 9 muestra el número de partículas fluorescentes para el VGluT2 cuantificadas en el ATV de animales con diferente condición sexual. Los animales sexualmente saciados expresaron un número de partículas fluorescentes significativamente mayor en comparación con los machos control ( $p \leq 0.001$ ) y los que ejecutaron 1 eyaculación ( $p \leq 0.001$ ).



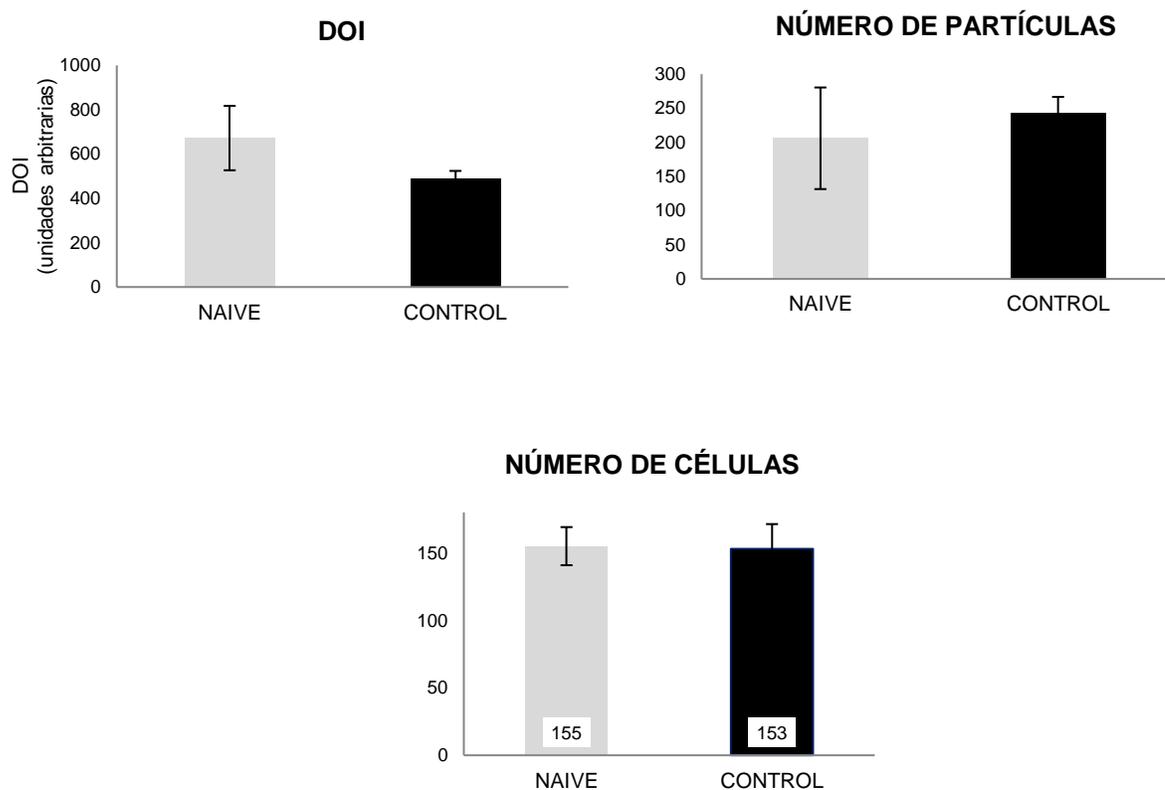
**Figura 9:** Número de partículas fluorescentes al RNAm de VGluT2 presentes en las neuronas del ATV de ratas macho con diferente condición sexual. Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  esm. ANOVA de una vía, seguida de Holm-Sidak  $***p < 0.001$ ;  $n=3$ /grupo. Acercamiento digital empleando el programa Image J de una neurona completa presente en fotomicrografías representativas de microscopio confocal, en blanco y negro, de células positivas para el RNAm de VGluT2 en los distintos grupos (panel A). En el panel B se muestra un acercamiento digital de los recuadros rojos marcados en A.

La figura 10 muestra la cuantificación del número total de células positivas al RNAm de VGluT2 en el ATV de animales con diferente condición sexual. No se observaron diferencias significativas entre grupos.



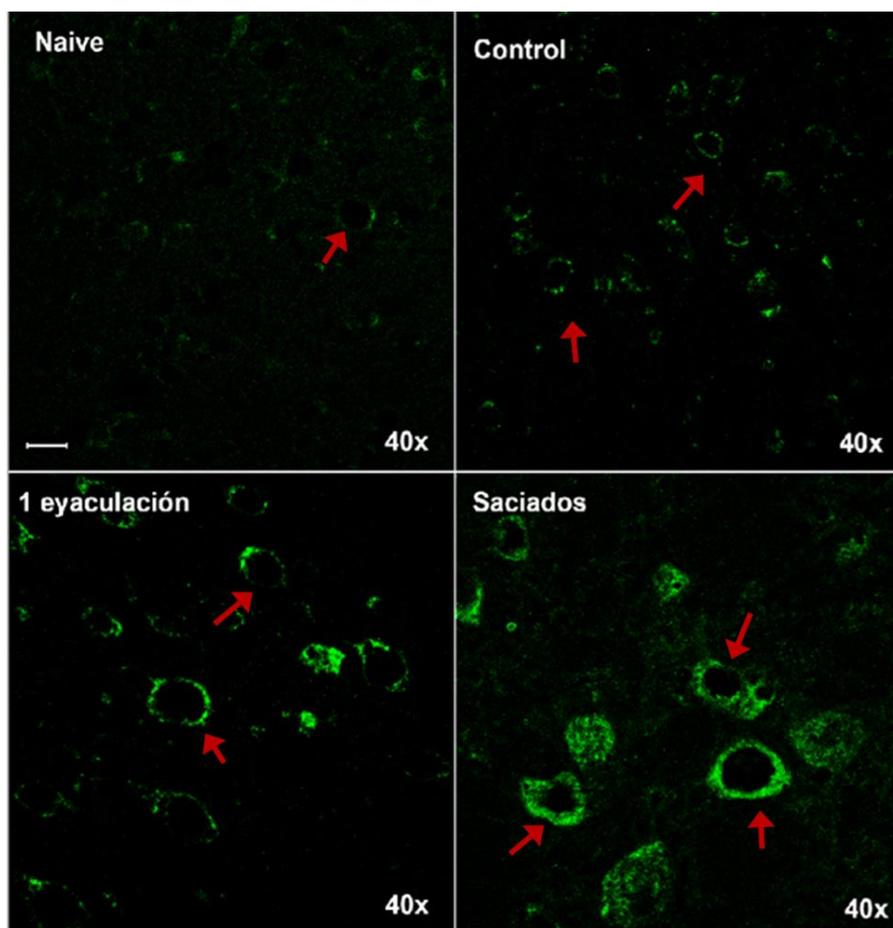
**Figura 10:** Cuantificación del número de células positivas para el RNAm de VGluT2 en el ATV de machos con diferente condición sexual. ANOVA de una vía seguida de Holm-Sidak ns. ( $n=3$ /grupo).

La figura 11 muestra la comparación de los distintos parámetros entre machos sexualmente expertos sin actividad sexual reciente y machos sexualmente naïve. No hubo diferencias significativas en ninguno de los parámetros analizados (DOI, número de partículas y número de células marcadas para VGluT2).



**Figura 11:** DOI, número de partículas y número de células positivas para el RNAm de VGluT2 en ratas sexualmente expertas y ratas sexualmente naïve. Prueba t, ns (n=3/grupo).

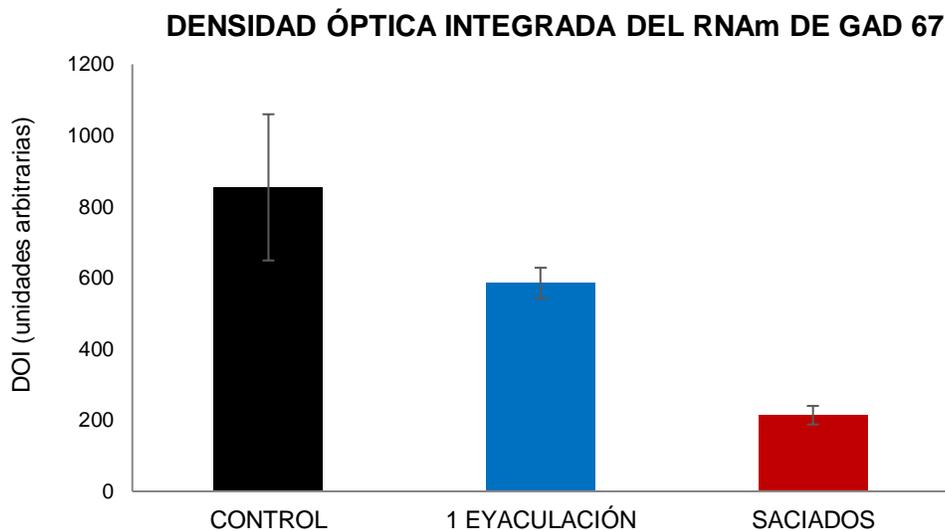
La figura 12 muestra imágenes representativas de la inmunorreactividad del RNAm de VGlut2 en un campo óptico completo, adquirido con el objetivo 40x del microscopio confocal, en el ATV de animales con distinta condición sexual. Se observan diferencias en la expresión del mensajero para VGlut2; las imágenes de machos que no tuvieron actividad sexual previa al sacrificio (grupo control) y de los que realizaron 1 eyaculación presentan una expresión similar del mensajero, mientras que los machos sexualmente saciados presentan una expresión mayor. Al comparar la fluorescencia de machos sexualmente naïve con la del grupo control que no tuvieron actividad sexual previa al sacrificio, los machos naïve presentaron una menor expresión del mensajero de VGlut2.



**Figura 12:** Fotomicrografías representativas de neuronas positivas al RNAm de VGlut2 en el ATV de machos con diferente condición sexual. Las flechas rojas indican células que expresan el mensajero de VGlut2. Microscopía confocal, amplificación 40x; barra de escala =20  $\mu$ m.

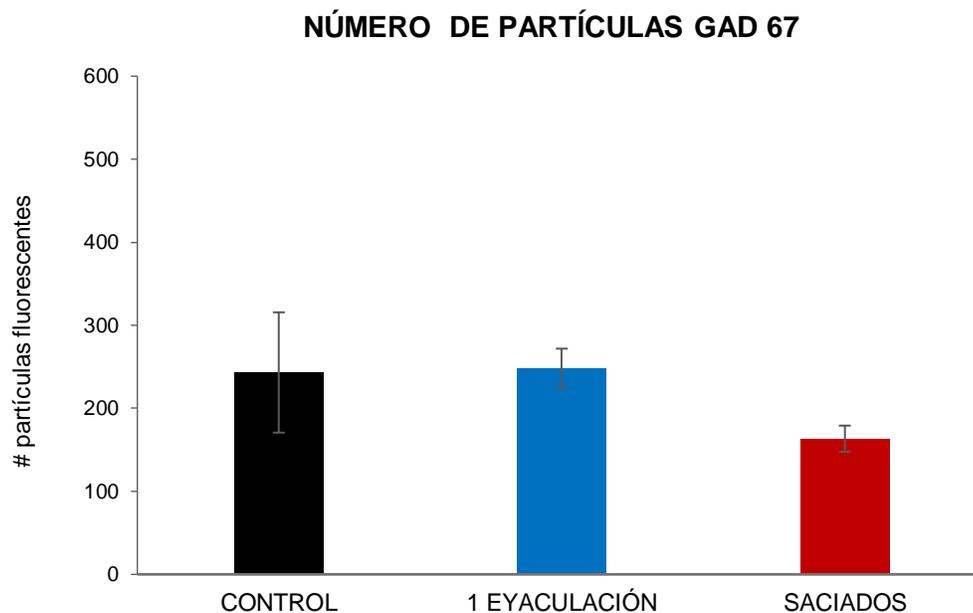
## Efecto de la condición sexual sobre los niveles de RNAm de la enzima GAD 67 en el ATV

La figura 13 muestra la DOI para el RNAm de GAD 67 en neuronas del ATV en machos con distinta condición sexual. En la gráfica se observa una tendencia a la disminución en los valores de DOI del RNAm para GAD 67 tanto en los machos que realizaron 1 eyaculación como en los que copularon hasta la saciedad con respecto a los valores del grupo control; sin embargo, por ANOVA ésta no alcanzó significancia estadística.



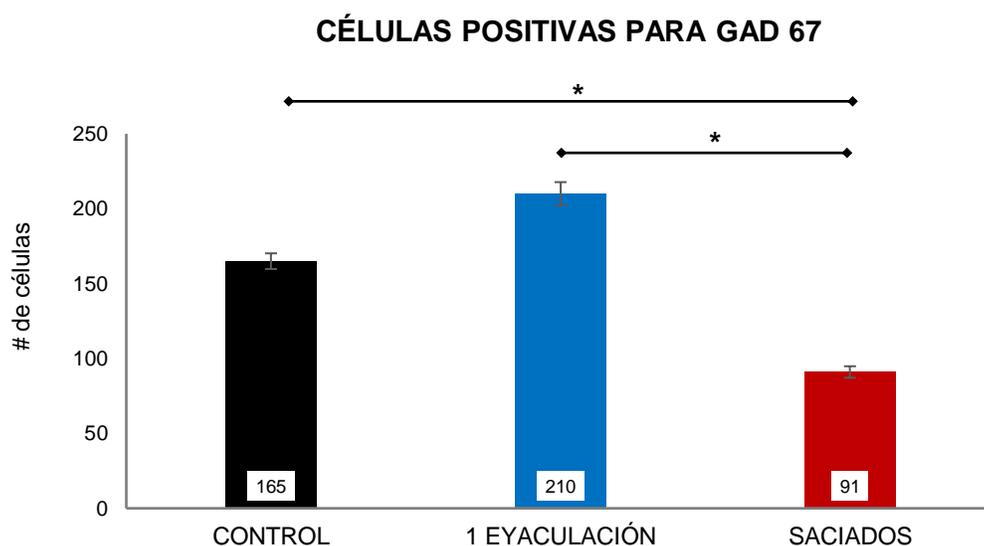
**Figura 13:** DOI del RNAm de GAD 67 de ratas control, machos que ejecutaron 1 eyaculación o que copularon hasta la saciedad. Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  esm. ANOVA de una vía ns,  $n=3$ /grupo.

La cuantificación del número de partículas fluorescentes para el mensajero de GAD 67 presentes en las neuronas del ATV de estos animales tampoco mostró diferencias significativas en ninguna de las condiciones sexuales (Figura 14).



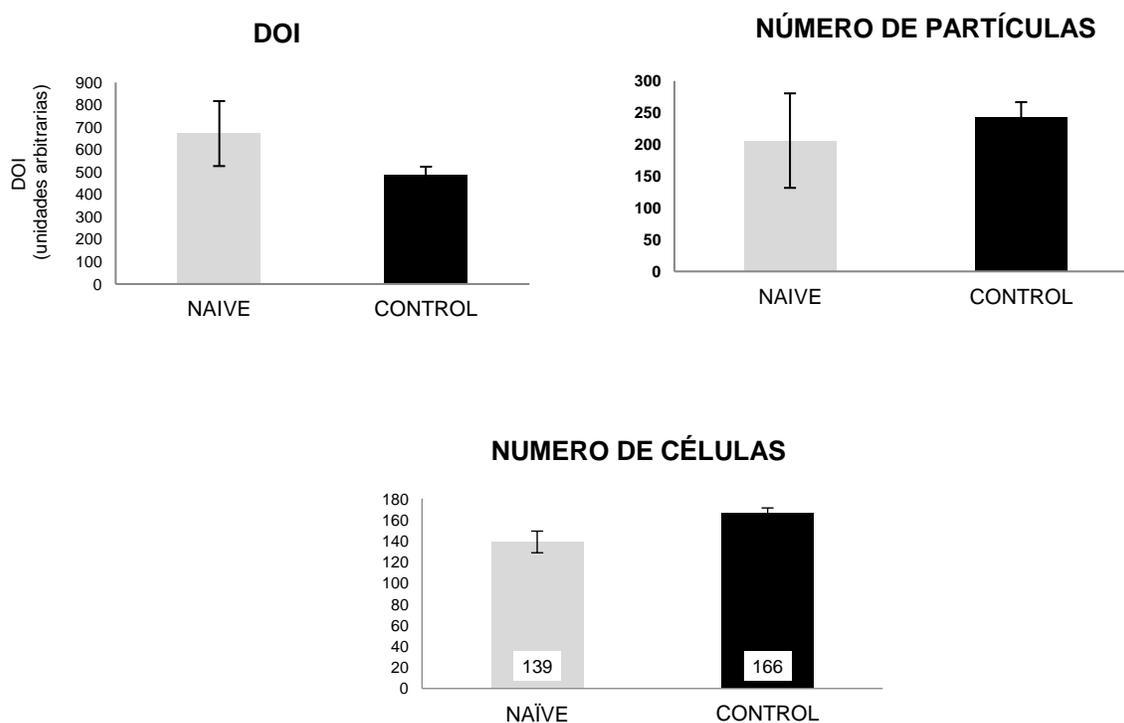
**Figura 14:** Número de partículas fluorescentes para el RNAm de GAD 67 presentes en las neuronas del ATV de ratas macho con diferente condición sexual. Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  esm. ANOVA de una vía, ns.

La figura 15 muestra el número total de células positivas para el RNAm de GAD 67 en el ATV los animales con diferente condición sexual. Se aprecia un número significativamente menor de células que expresan el mensajero de GAD 67 en los animales sexualmente saciados con respecto al grupo control y en comparación con el grupo que realizó 1 eyaculación (ANOVA de una vía seguida de Holm-Sidak  $p < 0.05$  para ambas comparaciones).



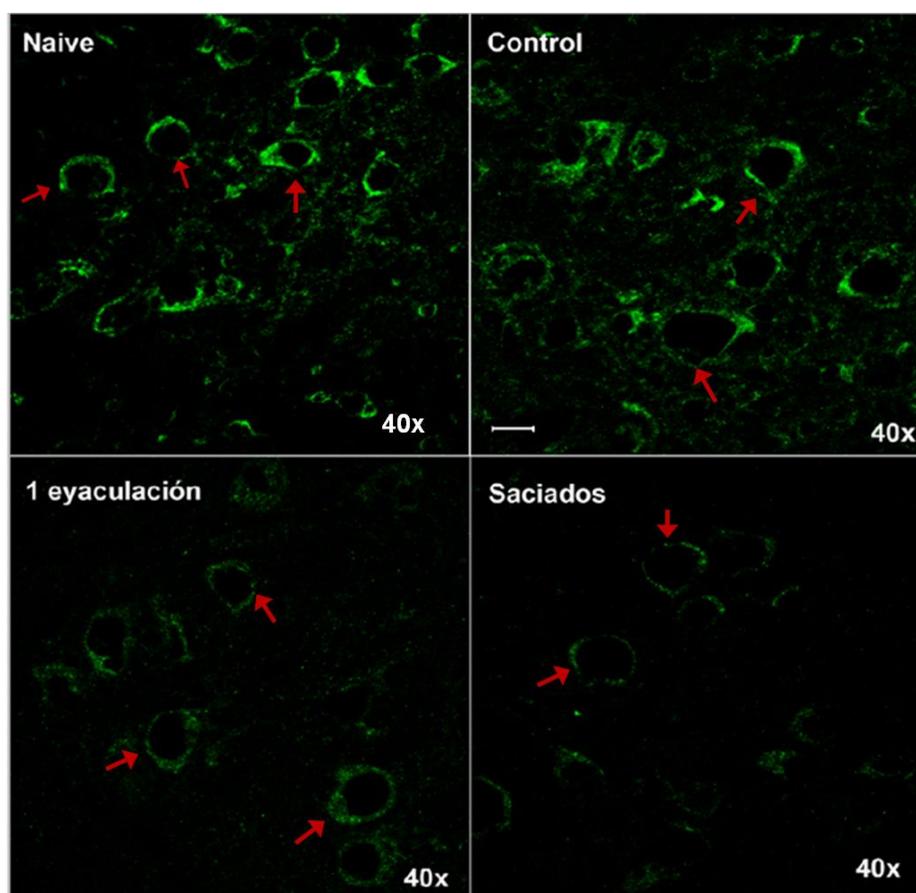
**Figura 15:** Cuantificación del número de células inmunorreactivas para el RNAm de GAD 67 en el ATV de machos con diferente condición sexual. ANOVA de una vía seguida de Holm-Sidak  $p < 0.05$  ( $n = 3/\text{grupo}$ ).

La comparación de los distintos parámetros (DOI, número de partículas y número de células marcadas para GAD 67) entre los machos sexualmente expertos (control) que no tuvieron actividad previa al sacrificio y el grupo de machos sexualmente *naïve* no mostró diferencias significativas en ninguno de los parámetros analizados (ANOVA seguida de Holm-Sidak,  $P > 0.05$ ). Estos resultados se muestran en la figura 16.



**Figura 16:** DOI, número de partículas y número de células positivas para GAD 67 presentes en animales sexualmente expertos y sexualmente *naïve*. Prueba *t* ( $n=3$ /grupo).

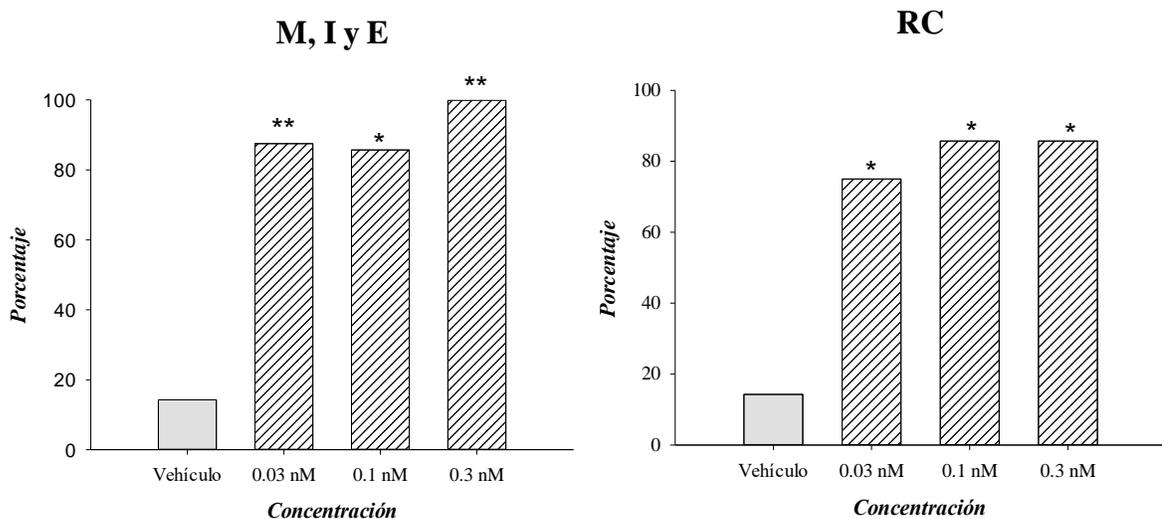
La figura 17 muestra fotomicrográficas de microscopio confocal de las células marcadas para el RNAm de GAD 67 en el ATV de machos con diferente condición sexual. La intensidad de la señal para el RNAm de GAD 67 fue mayor en los cortes provenientes de machos sexualmente naïve y sexualmente expertos que no tuvieron actividad sexual previa al sacrificio (grupo control) en comparación con los de machos que ejecutaron 1 eyaculación y los de machos sexualmente saciados. En este último grupo se presentó la señal más baja del mensajero. Cualitativamente no se observa diferencia en la expresión del mensajero de GAD 67 entre los machos sexualmente naïve y sexualmente expertos (grupo control).



**Figura 17:** Fotomicrográficas representativas de neuronas positivas al RNAm de GAD 67 en el ATV de ratas macho sexualmente naïve, sexualmente expertas, que eyacularon 1 vez y que copularon hasta la saciedad. Las flechas rojas señalan células que expresan a GAD 67. Amplificación 40X en microscopía confocal, barra de escala igual a 20 µm.

## Efecto de la administración intra ATV de diferentes concentraciones de orexina A

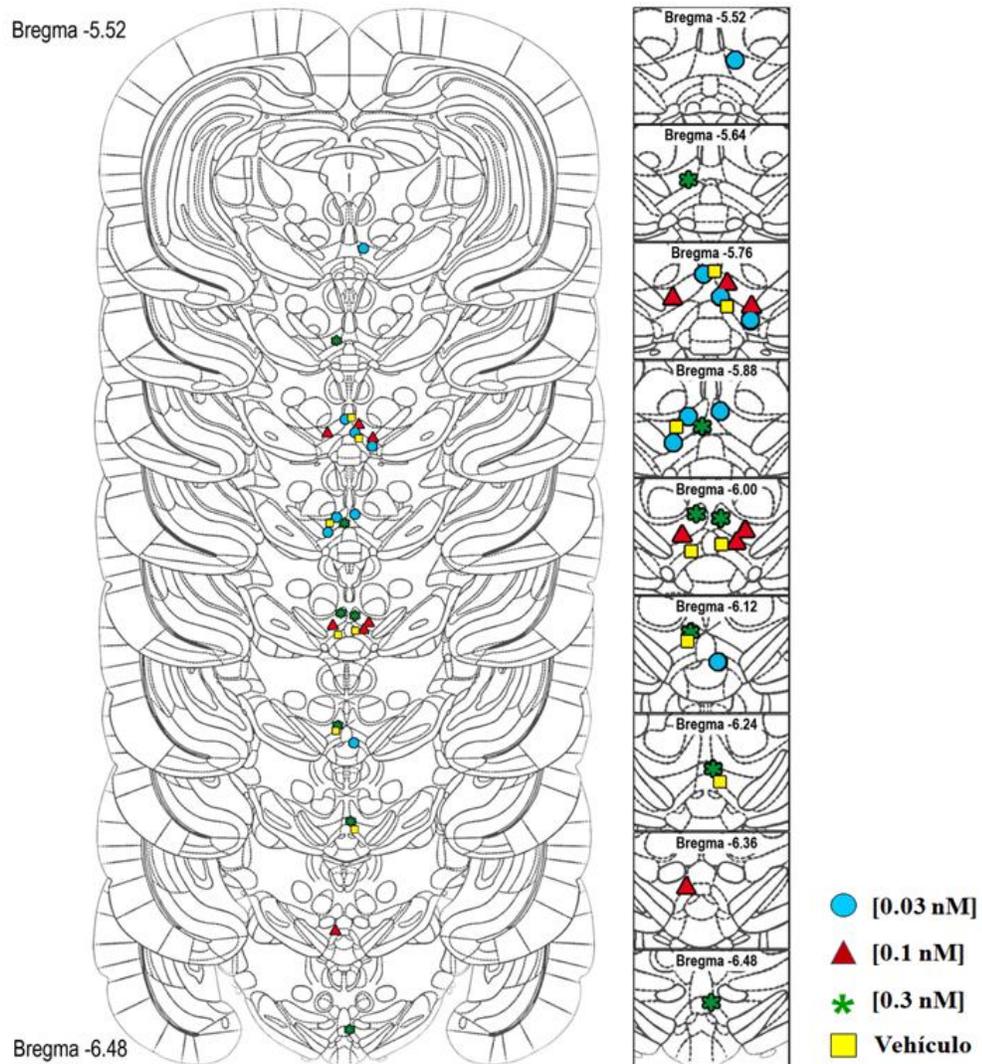
En la figura 18 se muestra la proporción de animales sexualmente saciados que presentó las respuestas de monta (*M*), de intromisión (*I*) y de eyaculación (*E*) y que reinició la cópula después de la eyaculación (*RC*), en respuesta a la administración de diferentes concentraciones de orexina A (0.03nM -0.3 nM). Como se puede observar, la orexina A aumentó significativamente la proporción de animales saciados que copuló hasta la eyaculación en comparación con el grupo que recibió vehículo, a todas las concentraciones utilizadas (7/8 para 0.03 nM, 6/7 para 0.1 nM y 7/7 para 0.3 nM; 1/7 para vehículo; F de Fisher vs control,  $P \leq 0.01$ ,  $P < 0.05$  y  $P < 0.01$ , respectivamente). La proporción de ratas saciadas que reinició la cópula después de la eyaculación en respuesta al tratamiento también aumentó significativamente (6/8 para 0.03nM y 6/7 para 0.1 y 0.3 nM; F de Fisher  $p < 0.05$  para cada concentración vs el grupo tratado con vehículo).



**Figura 18:** Porcentaje de animales que muestra las conductas de monta (*M*), de intromisión (*I*), de eyaculación (*E*) y que reinicia la cópula después de la eyaculación (*RC*) en respuesta a la administración intra ATV de orexina A [0.03 nM,  $n=8$ ], [0.1 nM,  $n=7$ ], [0.3 nM,  $n=7$ ] o vehículo ( $n=7$ ). Prueba F de Fisher, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

### Verificación de los sitios de inyección

La figura 19 muestra las anterioridades del ATV respecto de bregma (Paxinos & Watson, 2009) en las que se ubicaron las cánulas de inyección. La columna adyacente muestra un acercamiento de la región donde se localizaron los sitios de inyección.



**Figura 19:** Localización de los sitios de inyección de las diferentes concentraciones de orexina A y de vehículo en el ATV de ratas macho sexualmente saciadas (Paxinos & Watson, 2009).

### **Actividad ambulatoria espontánea**

El análisis de la actividad ambulatoria espontánea muestra que el tratamiento con orexina A en ratas macho sexualmente saciadas no provocó cambios significativos en dicha actividad. (Tabla 4).

Tratamiento	Concentración (nM)	n	Actividad ambulatoria ± esm	Estadística
Orexina A	0.03	8	647 ± 86.42	ANOVA de Kruskal Wallis Dunn's H = 6.423 P = 0.093
	0.1	7	1201 ± 270.99	
	0.3	7	1116 ± 156.95	
	Vehículo	7	842 ± 158.26	

**Tabla 4:** Actividad ambulatoria espontánea de machos sexualmente saciados tratados con orexina A o su vehículo por vía intra-ATV.

## DISCUSIÓN

---

### **Efecto de la actividad sexual intensa sobre el contenido de RNAm de VGluT2 en las neuronas del área tegmental ventral (ATV)**

La cópula es una conducta recompensante que activa al MLD, lo que induce un aumento en la liberación de DA en el NAcc. La actividad de las neuronas dopaminérgicas del MLD está regulada por neuronas glutamatérgicas y neuronas GABAérgicas en el ATV. Durante la cópula, la actividad de estas neuronas GABAérgicas se inhibe, mientras que la de las neuronas glutamatérgicas aumenta, lo que permite que haya una liberación fásica de DA en el NAcc (Kalló y cols., 2015). Se sabe que durante el desarrollo de la saciedad sexual los niveles de DA permanecen elevados (Fiorino y cols., 1997), pero no se sabe si los cambios en la actividad de las neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas del ATV se mantienen.

Considerando estos antecedentes analizamos si la cópula hasta la saciedad producía cambios sostenidos en la actividad de las neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas del ATV, que se reflejaran en cambios en los niveles de expresión del RNAm de VGluT2 y del RNAm de GAD 67. Nuestros resultados muestran que la actividad sexual intensa que tiene lugar durante una sesión de cópula hasta la saciedad produce un incremento en el contenido del RNAm de VGluT2 y una disminución en el número de células positivas para el RNAm de la GAD 67, así como una clara tendencia a disminuir el contenido del RNAm de GAD 67, que no alcanzó significancia estadística.

En condiciones basales, las neuronas dopaminérgicas del MLD liberan DA de forma tónica (Lobb y cols., 2011). Esta actividad se debe a la influencia de neuronas GABAérgicas locales que ejercen una inhibición tónica sobre la actividad de las neuronas dopaminérgicas (Lobb y cols., 2011; Kalló y cols., 2015). Cuando un animal anticipa o experimenta un estímulo recompensante, el disparo de las neuronas dopaminérgicas se incrementa y la liberación tónica de DA en el NAcc se transforma en una liberación fásica. Este cambio está dado por la remoción del

control GABAérgico inhibitorio, así como por la activación de las neuronas glutamatérgicas (Lobb y cols., 2011; Kalló y cols., 2015).

El incremento en la expresión del RNAm para VGlut2 encontrado en este trabajo podría reflejar una activación intensa de las neuronas glutamatérgicas del ATV durante la cópula hasta la saciedad, ya que un aumento sostenido en la liberación de glutamato durante ese proceso podría inducir cambios en la transcripción de los genes que codifican para los VGlut's (De Gois y cols., 2005), que se reflejarían en un incremento en la cantidad de RNAm de VGlut2.

Como se mencionó en la introducción, existen evidencias de que el aumento en la actividad de las neuronas glutamatérgicas produce un aumento en la expresión del RNAm para VGlut2 (Scott y cols., 2008; Glazova y cols., 2015; Uezato y cols., 2009).

Se deben contemplar mecanismos de regulación adicionales que controlen de manera fina la activación de la transcripción de un gen (Lazarevic y cols., 2013). El DNA se transcribe a RNAm y éste sufre modificaciones postranscripcionales antes de convertirse en un RNAm maduro. Entre éstas la que protege al RNAm de la degradación por acción de las ribonucleasas (Mc Gylvery & Golstein, 1986). La poliadenilación que adiciona residuos de ácido adenílico puede aumentar la síntesis de proteínas (Carter & Murphy, 1991), ya que, si el mensajero se hace más estable permanecerá por más tiempo en la célula y estará disponible cuando sea necesario para ser traducido a proteína. El incremento observado en este trabajo en la expresión del RNAm para VGlut2 en los animales que copularon hasta la saciedad, pudiera deberse a un aumento en la estabilidad de su RNAm (Zingg y cols., 1988) y/o a un aumento en la transcripción del gen Slc17a6 que codifica para VGlut2 (Bai y cols., 2001). Dado que la sonda empleada en el presente estudio estuvo dirigida al RNAm que da origen al VGlut2 (RNAm maduro) y no al RNA heteronuclear (RNA precursor del RNAm, sin modificaciones postranscripcionales), no se descarta la posibilidad de que el aumento en la señal observada en respuesta a la cópula se deba tanto al aumento en la estabilidad del RNAm de VGlut2 como al incremento en la transcripción de su gen. Se

necesitarían realizar estudios adicionales en los que se determine el tamaño de la cola de poly A del RNAm de VGluT2 en el ATV antes y después de someter a los animales al paradigma de saciedad sexual, así como una hibridación con una sonda dirigida al RNA heteronuclear para determinarlo.

Dado que no hubo diferencias en el número de células positivas a VGluT2 entre animales con diferente cantidad de actividad sexual, se descarta la posibilidad de que el incremento en el contenido de RNAm de VGluT2 se deba a un aumento en el número de células que lo expresaban. Por lo tanto, el incremento detectado ocurre en las mismas neuronas que expresaban el RNAm de VGluT2 antes de la actividad sexual.

En todo caso, nuestro resultado sugiere que la cópula hasta la saciedad aumenta la actividad de las neuronas glutamatérgicas del ATV.

### **Influencia de la saciedad sexual sobre la expresión del RNAm de GAD 67**

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que la actividad sexual reciente no modifica significativamente el contenido de RNAm para la GAD 67 en las neuronas del ATV, aunque se presenta una clara tendencia a su disminución. Sin embargo, sí encontramos una disminución en el número de células positivas para el RNAm de GAD 67, lo que sugiere que la cópula intensa que tiene lugar durante el desarrollo de la saciedad mantiene disminuida la actividad de las neuronas locales GABAérgicas y en consecuencia la expresión del mensajero en los machos saciados la detectamos en muy pocas células.

Las neuronas GABAérgicas del ATV expresan receptores opioides tipo  $\mu$ , que al ser activados inhiben la liberación de GABA (Johnson & North, 1992). Se sabe que durante la eyaculación se liberan opioides endógenos (Szechtman y cols., 1981) que activan a los receptores  $\mu$  en el ATV (Balfour y cols., 2004). Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que los receptores  $\mu$  son internalizados

durante la cópula hasta la saciedad por acción de los opioides liberados en el periodo del establecimiento de la saciedad (Garduño-Gutiérrez y cols., 2013c).

Estos resultados nos permiten suponer que si durante la cópula hasta la saciedad los animales eyaculan repetidamente, también está ocurriendo una liberación constante de opioides cuya acción repercutirá en mantener inhibida la liberación de GABA durante todo el proceso de saciedad y en consecuencia disminuir la expresión del RNAm de GAD 67 y el número de células GABAérgicas positivas a dicho mensajero.

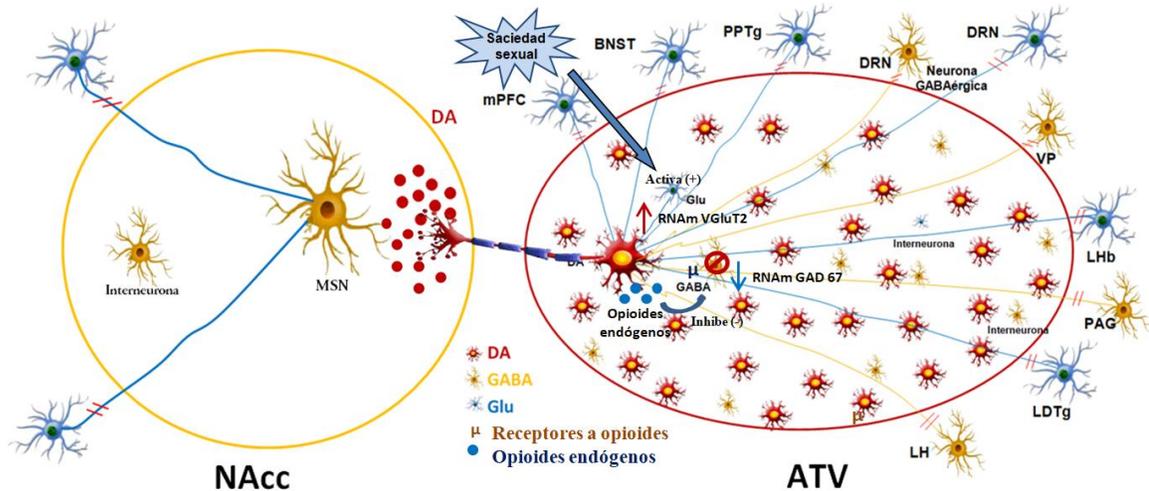
La enzima GAD 67 participa en la síntesis de GABA, ya que es la única isoforma de GAD que se encuentra como holoenzima (forma activa de la enzima) (Earlander y cols., 1991). Un cambio en la actividad de las neuronas GABAérgicas (aumento o disminución), modificará la actividad de GAD (Erickson cols., 2006). Considerando la actividad inhibitoria de los opioides endógenos sobre la liberación de GABA en el ATV, se podría especular que la tendencia a la disminución en el contenido del RNAm de GAD 67 en los animales que copularon hasta la saciedad, pudiera reflejar la disminución en la actividad de las neuronas GABAérgicas y, por lo tanto, un cambio en la tasa de transcripción de los genes que codifican para la enzima involucrada en dicha síntesis (Erickson cols., 2006; Hanno-lijima y cols., 2015).

La comparación del nivel de expresión del RNAm de VGluT2 y de GAD 67 entre machos sexualmente expertos que tuvieron un periodo de inactividad sexual y los machos sexualmente naïve no mostró diferencias, lo que sugiere que la experiencia sexual no modifica la expresión basal de los RNAm para VGluT2 y para GAD 67. En la bibliografía existen referencias que ponen de manifiesto que la experiencia sexual induce modificaciones morfológicas y moleculares en algunas estructuras cerebrales. Una de ellas determinó que la experiencia sexual aumentaba la densidad de espinas dendríticas en las MSN del NAcc (Pitchers et al., 2010).

En este trabajo estudiamos cambios a nivel molecular en el sistema GABAérgico y glutamatérgico en el ATV en respuesta a la cópula intensa. Sería interesante

explorar si los cambios en la expresión de los RNAm para VGlut2 y GAD 67 se traducen en cambios en la expresión de sus proteínas y establecer si dichas modificaciones tienen alguna relación con el cambio en el funcionamiento del circuito mesolímbico que subyace a la inhibición sexual de larga duración que caracteriza a los machos sexualmente saciados. En este sentido, existen datos que sugieren que la transmisión glutamatérgica está modificada en ratas saciadas. Se ha reportado que el antagonismo de receptores glutamatérgicos a las 24 hrs post saciedad revierte la inhibición sexual (Rodríguez-Manzo, 2015), mientras que en animales no saciados la activación de receptores glutamatérgicos facilita la cópula (Domínguez y cols., 2006). Por otro lado, la participación de la transmisión GABAérgica en el fenómeno de saciedad también se ha documentado en nuestro laboratorio ya que el antagonismo de los receptores GABA<sub>A</sub> induce la expresión de la cópula en machos sexualmente saciados, lo que sugiere que a las 24 hrs post-saciedad el tono GABAérgico se encuentra elevado y antagonizar las acciones del GABA, revierte la inhibición sexual (Rodríguez-Manzo & Canseco-Alba, 2017).

La figura 20 resume los eventos moleculares que pudieran estar ocurriendo en el ATV de ratas macho adultas en respuesta a la cópula hasta la saciedad y la interacción entre las neuronas GABAérgicas, glutamatérgicas y dopaminérgicas del MLD. También se representa el aumento en la liberación de DA por acción de la cópula en el NAcc (círculo amarillo),



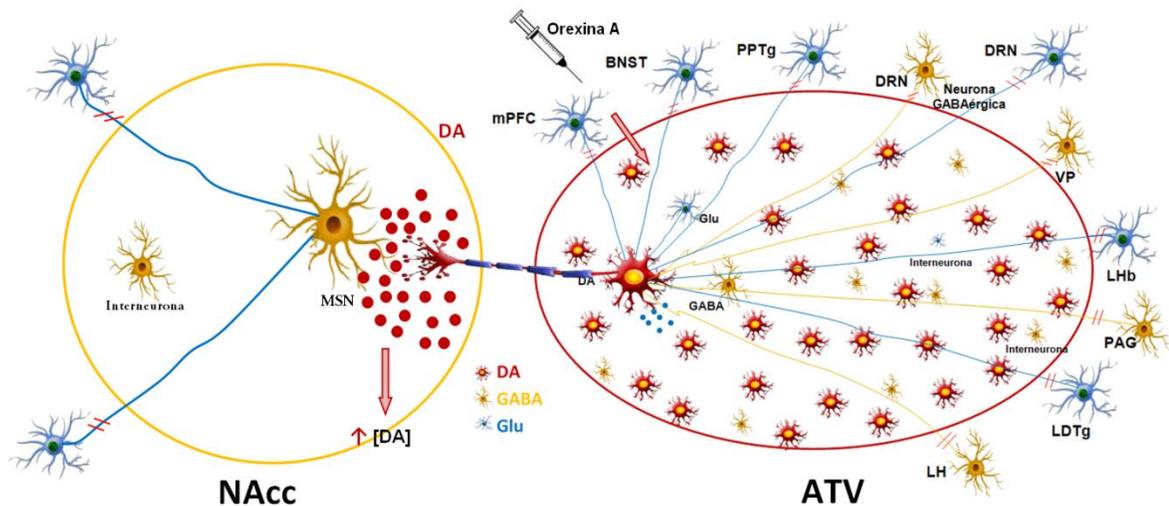
**Figura 20:** Diagrama hipotético de la posible interacción entre los sistemas GABAérgico y glutamatergico en el ATV durante la cópula hasta la saciedad con las neuronas GABAérgicas y glutamatergicas.

### Efecto de la administración intra ATV de Orexina A en la saciedad sexual

Si bien la cópula hasta la saciedad induce una inhibición de la conducta sexual de larga duración, esta inhibición, es reversible farmacológicamente. Se ha implicado la participación de varios sistemas de neurotransmisión en el mantenimiento de este estado inhibitorio (Fernández-Guasti & Rodríguez-Manzo, 1995; Rodríguez-Manzo., 1999; Rodríguez-Manzo, 2015; Rodríguez-Manzo & Canseco-Alba, 2017). Los datos obtenidos a través de distintas manipulaciones farmacológicas han llevado a establecer la hipótesis de que la reversión de la inhibición sexual de ratas sexualmente saciadas está dada por una interacción directa o indirecta con el sistema dopaminérgico. Se ha documentado que la administración de tanto de OxA como de OxB directamente en el ATV, induce un aumento en la liberación de DA en el NAcc (Narita y cols., 2006). Por lo tanto, el aumento en el porcentaje de machos saciados que copularon hasta la eyaculación y reiniciaron una segunda serie eyaculatoria, en respuesta a la administración intra-ATV de OxA, apoya la hipótesis de que un aumento en la transmisión dopaminérgica en el NAcc pudiera ser la vía final común para la reversión de la saciedad sexual.

Nuestro trabajo es el primero en determinar cambios a nivel del RNAm de dos proteínas que se modifican como resultado de cambios en la actividad neuronal en respuesta a la cópula intensa que tiene lugar en el desarrollo de la sociedad sexual, por lo que podemos sugerir que la actividad glutamatérgica se encuentra aumentada durante el periodo de tiempo en el que se establece la sociedad y la transmisión GABAérgica se encuentra disminuida en este mismo periodo de tiempo.

La figura 21 resume esquemáticamente el efecto de la administración de orexina A intra ATV en ratas macho sexualmente saciados



**Figura 21:** Representación del efecto de la administración de la orexina A en el ATV en machos sexualmente saciados.

## CONCLUSIONES

---

1. La cópula hasta la saciedad induce un aumento en la expresión del RNAm de VGluT2 en las neuronas del ATV a las 24 hrs post-saciedad, lo que sugiere que la actividad de las neuronas glutamatérgicas está aumentada durante el desarrollo de la saciedad sexual.
2. La cópula hasta la saciedad induce una disminución en la expresión del RNAm de la enzima GAD 67 en las neuronas del ATV que sugiere que la actividad neuronal GABAérgica en esta región cerebral está disminuida durante el desarrollo de la saciedad sexual.
3. La disminución en la actividad neuronal GABAérgica durante el desarrollo de la saciedad sexual disminuyó el número de células positivas a GAD 67 en el ATV.
4. La inducción de un aumento en la liberación de dopamina en el NAcc revierte la inhibición sexual de ratas sexualmente saciadas, lo que apoya la hipótesis de que la transmisión dopaminérgica en el NAcc pudiera ser la vía final común para la reversión farmacológica de la inhibición sexual de ratas sexualmente saciadas.

## PERSPECTIVAS

---

1. Medir los niveles de proteína del VGluT2 en el ATV para determinar si el incremento en la expresión del RNAm que encontramos se refleja en un aumento en la traducción de la proteína de dicho transportador.
2. Medir los niveles de la proteína de GAD 67 en el ATV para ver si la tendencia a disminuir que nosotros observamos en la expresión del mensajero se mantiene en la síntesis de proteína de dicha enzima.
3. Realizar una hibridación doble para analizar si co-localizan el RNAm de VGluT2 y el de GAD 67 y poder determinar si el incremento del RNAm de VGluT2 en respuesta a la saciedad se presenta en una subpoblación de neuronas GABAérgicas o si son poblaciones neuronales independientes.
4. Medir el mensajero de *c-fos* por una hibridación doble con GAD 67 o con VGluT2 para determinar actividad neuronal en el ATV en la población de neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas.

## BIBLIOGRAFÍA

---

Balfour E.M., Yu L. & Coolen L. (2004). Sexual behavior and sex-associated environmental cues activate the mesolimbic system in male rats. *Neuropsychopharmacology*, 29(4), 718-730.

Bariselli S., Glangetas C., Tzanoulinou S. & Bellone C. (2016). Ventral tegmental area subcircuits process rewarding and aversive experiences. *Journal of Neurochemistry*, 139(6), 1071-1080.

Beach F. & Jordan L. (1956). Sexual exhaustion and recovery in the male rat. *Journal of Experimental Psychology*, 8, 121-133.

Berridge K.C. (2007). The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology*, 191(3), 391-431.

Bohlen O. Von und Halbach & Demietzel R. (2002). *Neurotransmitters and Neuromodulators*, (1ª ed. pp 64-89 y 120-126). Alemania: Wiley-VCH Press.

Bowers G., Cullinan W.E. & Herman J.P. (1998). Region-specific regulation of glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA expression in central stress circuits. *Journal of Neuroscience*, 18(15), 5938-5947.

Carter D.A. & Murphy D. (1992). Rapid changes in poly (A) tail length of vasopressin and oxytocin mRNAs form a common early component of neurohypophyseal peptide gene activation following physiological stimulation. *Neuroendocrinology*, 53(1), 1-6.

Cullinan W.E., Herman J.P. & Watson S.J. (1993). Ventral subicular interaction with the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence for a relay in the bed nucleus of the stria terminalis. *Journal of Comparative Neurology*, 332, 1–20.

Damsma G., Pfaus J.G., Wenkstern D.G., Phillips A.G. & Fibiger H.C. (1992). Sexual behavior increases dopamine transmission in the nucleus accumbens and striatum of male rats: comparison with novelty and locomotion. *Behavioral Neuroscience*, 106(1), 81-191.

De Gois S., Schäfer M.K., Defamie N., Chen C., Ricci A., Weihe E., Varoqui H. & Erickson J.D. (2005). Homeostatic scaling of vesicular glutamate and GABA transporter expression in rat neocortical circuits. *Journal of Neuroscience*, 25(31), 7121-7133.

De Graauw M., Hensbergen P. & Van de Water B. (2006). Phospho-proteomic analysis of cellular signaling. *Electrophoresis*, 27(13), 2676-2686.

Dominguez J.M., Gil M. & Hull E.M. Preoptic glutamate facilitates male sexual behavior. *Journal of Neuroscience*, 26(6), 1699–703.

Erickson J.D., De Gois S., Varoqui H., Schafer M.K. & Weihe E. (2006). Activity-dependent regulation of vesicular glutamate and GABA transporters: a means to scale quantal size. *Neurochemistry International*, 48(6-7), 643-649. Review.

Erlander M.G., Tillakaratne N.J., Feldblum S., Patel N. & Tobin A.J. (1991). Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron*, 7(1), 91-100.

Esclapez M., Tillakaratne N.J., Kaufman D.L., Tobin A.J. & Houser C.R. (1994). Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms. *Journal of Neuroscience*, 14(3), 1834-1855.

Esclapez M., Tillakaratne N.J., Tobin A.J. & Houser C.R. (1993). Comparative localization of mRNAs encoding two forms of glutamic acid decarboxylase with nonradioactive in situ hybridization methods. *Journal of Comparative Neurology*, 331(3), 339-362.

Fiorino D.F., Coury A., Phillips A.G. (1997). Dynamic changes in nucleus accumbens dopamine efflux during the Coolidge effect in male rats. *Journal of Neuroscience*, 17(12), 4849-4855.

Freneau R.T., Burman J., Qureshi T., Tran C.H., Proctor J., Johnson R.J., Zhang H., Sulzer D., Copenhagen D.R., Storm-Mathisen J., Reimer R.J., Chaudhry F.A. & Edwards R.H. (2002). The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(22), 14488-14493.

Garduño-Gutiérrez R., Guadarrama-Bazante L., León-Olea M. & Rodríguez-Manzo G. (2013a). Endogenous opioids mediate the sexual inhibition but not the drug hypersensitivity induced by sexual satiation in male rats. *Behavioral Neuroscience*, 127(3), 458-464.

Garduño-Gutiérrez R., Guadarrama-Bazante L., León-Olea M. & Rodríguez-Manzo G. (2013b). The mesolimbic system participates in the naltrexone-induced reversal of sexual exhaustion: opposite effects of intra-VTA naltrexone administration on copulation of sexually experienced and sexually exhausted male rats. *Behavioural Brain Research*, 256, 64-71.

Garduño-Gutiérrez R., Guadarrama-Bazante L., León-Olea M. & Rodríguez-Manzo G. (2013c). 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 Research*, 1541, 22-32.

Geyer L.A. & Barfield R.J. (1978). Influence of gonadal hormones and sexual behavior on ultrasonic vocalization in rats: I. Treatment of females. *The Journal of Comparative Psychology*, 92(3), 438-446.

Glazova M.V., Nikitina L.S., Hudik K.A., Kirillova O.D., Dorofeeva N.A., Korotkov A.A. & Chernigovskaya E.V. (2015). Inhibition of ERK1/2 signaling prevents epileptiform behavior in rats prone to audiogenic seizures. *Journal of Neurochemistry*, 132(2), 218-229.

Gras C., Herzog E., Bellenchi G.C., Bernard V., Ravassard P., Pohl M., Gasnier B., Giros B. & El Mestikawy S. (2002). A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *Journal of Neuroscience*, 22(13), 5442-5451.

Hanno-Iijima Y., Tanaka M. & Iijima T. (2015). Activity-Dependent Bidirectional Regulation of GAD Expression in a Homeostatic Fashion Is Mediated by BDNF-Dependent and Independent Pathways. *Plos One*, 10(8), 1-18.

Hinoi E., Takarada T., Tsuchihashi Y. & Yoneda Y. (2005). Glutamate transporters as drug targets. *Current Drug Targets CNS Neurology Disorders*, 4(2), 211-220.

Hull, E., y Rodríguez-Manzo, G. (2017). Male sexual behavior. En D. W. Pfaff y M. Joëls (Eds.), *Hormones, Brain and Behavior* (3°, Vol. 1, pp. 1–57). Amsterdam: Academic Press.

Ikemoto S. (2010). Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: a neurobiological theory. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, 35(2), 129-150.

Johnson S.W. & North R.A. (1992). Two types of neurone in the rat ventral tegmental area and their synaptic inputs. *Journal of Physiology*, 450, 455-468.

Kalló I., Molnár C.S., Szöke S., Fekete C., Hrabovszky E. & Liposits Z. (2015). Area-specific analysis of the distribution of hypothalamic neurons projecting to the rat ventral tegmental area, with special reference to the GABAergic and glutamatergic efferents. *Frontiers in neuroanatomy*, 9(112), 1-18.

Kaufman D.L., Houser C.R. & Tobin A.J. (1991). Two forms of the gamma-aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions. *Journal of Neurochemistry*, 56(2):720-723.

Lazarevic V., Pothula S., Andres-Alonso M. & Fejtova A. (2013). Molecular mechanisms driving homeostatic plasticity of neurotransmitter release. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7(244), 1-10. Review.

Litwak J., Mercugliano M., Chesselet M.F. & Oltmans G.A. (1990). Increased glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA and GAD activity in cerebellar

Purkinje cells following lesion-induced increases in cell firing. *Neuroscience Letters*, 116, 179–183.

Lobb C.J., Troyer T.W., Wilson C.J., Paladini C.A. (2011). Disinhibition bursting of dopaminergic neurons. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 5(25), 1-8.

Margolis E.B., Toy B., Himmels P., Morales M. & Fields H.L. (2012). Identification of rat ventral tegmental area GABAergic neurons. *PLoS One* 7(7), e42365, 1-12.

Martin D.L. & Rimvall K. (1993). Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain. *Journal of Neurochemistry*, 60(2), 395-407.

Matsumoto J., Urakawa S., Hori E., de Araujo M.F., Sakuma Y., Ono T. & Nishijo H. (2012). Neuronal responses in the nucleus accumbens shell during sexual behavior in male rats. *The Journal of Neuroscience*, 32(5), 1672-1686.

Matsumoto T., Numakawa T., Yokomaku D., Adachi N., Yamagishi S., Numakawa Y., Kunugi H. & Taguchi T. (2006). Brain-derived neurotrophic factor-induced potentiation of glutamate and GABA release: different dependency on signaling pathways and neuronal activity. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 31(1):70-84.

McCullumsmith R.E. & Meador-Woodruff J.H. (2003). Expression of transcripts for the vesicular glutamate transporters in the human medial temporal lobe. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1003, 438-442.

McGilvery R.W. & Goldstein G.W. (1990). *Bioquímica*. México D.F., Ed. Interamericana.

Michaelis E.K. (1998). Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Progress in Neurobiology*, 54(4), 369-415.

Morales M. & Margolis E.B. (2017). Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behavior. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(2), 73-85.

Narita M., Nagumo Y., Hashimoto S., Narita M., Khotib J., Miyatake M., Sakurai T., Yanagisawa M., Nakamachi T., Shioda S. & Suzuki T. (2006). Direct involvement of orexinergic systems in the activation of the mesolimbic dopamine pathway and related behaviors induced by morphine. *Journal of Neuroscience*, 26(2), 398-405.

Nauta W.J. (1958). Hippocampal projections and related neural pathways to the midbrain in the cat. *Brain*, 81(3), 319-340.

Owens D.F. & Kriegstein A.R. (2002). Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nature Reviews*, 3(9), 715-727.

Paxinos G. & Watson C. (2009). *The Rat Brain In Stereotaxic Coordinates. Compact (6<sup>th</sup> ed.)*. China, Academic Press.

Peng L., Hertz L., Huang R., Sonnewald U., Petersen S.B., Westergaard N., Larsson O. & Schousboe A. (1993). Utilization of glutamine and of TCA cycle constituents as precursors for transmitter glutamate and GABA. *Developmental Neuroscience*, 15(3-5), 367–377.

Pfaus J.G. & Phillips A.G. (1991). Role of dopamine in anticipatory and consummatory aspects of sexual behavior in the male rat. *Behavioral neuroscience*, 105(5), 727-743.

Pfaus J.G., Damsma G., Nomikos G.G., Wenkstern D.G., Blaha C.D., Phillips A.G. & Fibiger H.C. (1990). Sexual behavior enhances central dopamine transmission in the male rat. *Brain Research*, 530(2), 345-348.

Pitchers K.K., Balfour M.E., Lehman M.N., Richtand N.M., Yu L. & Coolen L.M. (2010). Neuroplasticity in the mesolimbic system induced by natural reward and subsequent reward abstinence. *Biological Psychiatry*, 67(9), 872-879.

Pitchers K.K., Schmid S., Di Sebastiano A.R., Wang X., Laviolette S.R., Lehman M.N. & Coolen L.M. (2012). Natural reward experience alters AMPA and NMDA receptor distribution and function in the nucleus accumbens. *PLoS One*, 7(4), 1-10.

Purves D., Augustine, Fitzpatrick, Hall, LaMantia, McNamara & Williams (2004), *Neurociencia*, 3a ed., España, Ed. Panamericana.

Rodríguez-Manzo G. & Canseco-Alba A. (2017). A new role for GABAergic transmission in the control of male rat sexual behavior expression. *Behavioural Brain Research*, 320(2017), 21-29.

Rodríguez-Manzo G. & Fernandez-Guasti A. (1994). Reversal of sexual exhaustion by serotonergic and noradrenergic agents. *Behavioral Brain*, 62(2), 127-134.

Rodríguez-Manzo G. & Fernández-Guasti A. (1995). Opioid antagonists and the sexual satiation phenomenon. *Psychopharmacology (Berl)*, 122(2), 131-136.

Rodríguez-Manzo G. (1999). Yohimbine interacts with the dopaminergic system to reverse sexual satiation: further evidence for a role of sexual motivation in sexual exhaustion. *European Journal of Pharmacology*, 372(1), 1-8.

Rodríguez-Manzo G. (2015). Glutamatergic transmission is involved in the long lasting sexual inhibition of sexually exhausted male rats. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 131, 64-70.

Rodríguez-Manzo G., Guadarrama-Bazante I.L. & Morales-Calderon A. (2011). Recovery from sexual exhaustion-induced copulatory inhibition and drug hypersensitivity follow a same time course: two expressions of a same process? *Behavioral Brain Research*, 217(2), 253-260.

Rodríguez-Manzo G., Pellicer F. (2007). Electrical stimulation of the ventral tegmental area exerts opposite effects on male rat sexual behavior expression depending on the stimulated sub region. *Behavioral Brain Research*, 179(2), 310-313.

Rodríguez-Manzo G., Pellicer F. (2010). Electrical stimulation of dorsal and ventral striatum differentially alters the copulatory behavior of male rats. *Behavioral Neuroscience*, 124(5), 686-694.

Rodríguez-Manzo G., Pellicer F., Larsson K. & Fernandez-Guasti A. (2000). Stimulation of the medial preoptic area facilitates sexual behavior but does not reverse sexual satiation. *Behavioral Neuroscience*, 114(3), 553-560.

Sánchez-Catalán M.J., Kauffling J., Georges F., Veinante P. & Barrot M. (2014). The antero-posterior heterogeneity of the ventral tegmental area. *Neuroscience*, 12(282), 198-216.

Schäfer M.K., Varoqui H., Defamie N., Weihe E. & Erickson J.D. (2002). Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 277(52), 50734-50748.

Scott A., Alfredson H. & Forsgren S. (2008). VGluT2 expression in painful Achilles and patellar tendinosis: evidence of local glutamate release by tenocytes. *Journal of Orthopaedic Research*, 26(5), 685-692.

Szabó G., Katarova Z., Körtvély E., Greenspan R.J. & Urbán Z. (1996). Structure and the promoter region of the mouse gene encoding the 67-kD form of glutamic acid decarboxylase. *DNA and Cell Biology*, 15(12), 1081-1091.

Szechtman H., Hershkowitz M. & Simantov R. (1981). Sexual behavior decreases pain sensitivity and stimulated endogenous opioids in male rats. *European Journal of Pharmacology*, 70(3), 279-285.

Takamori S., Rhee J.S., Rosendmund C. & Jahn R. (2000). Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature*, 14(407), 189-194.

Takamori S., Rhee J.S., Rosendmund C. & Jahn R. (2001). Identification of differentiation-associated brain-specific phosphate transporter as a second vesicular glutamate transporter (VGluT2). *Journal of Neuroscience*, 15(21), 1-6.

Tsai C.E. (1925). The optic tracts and centers of the opossum. *Didelphis virginiana*. *Journal of Comparative Neurology*, 39(2), 173-216.

Uezato A., Meador-Woodruff J.H. & McCullumsmith R.E. (2009). Vesicular glutamate transporter mRNA expression in the medial temporal lobe in major depressive disorder, bipolar disorder, and schizophrenia. *Bipolar Disorder*, 11(7), 711-725.

Wei J., Davis K.M., Wu H. & Wu J.Y. (2004). Protein phosphorylation of human brain glutamic acid decarboxylase GAD 65 and GAD67 and its physiological implications. *Biochemistry*, 43(20), 6182-6189.

Yamaguchi T., Sheen W. & Morales M. (2007). Glutamatergic neurons are present in the rat ventral tegmental area. *European Journal of Neuroscience*, 25(1), 106–118.

Yin H.S., Chen K., Shih J.C. & Tien T.W. (2009). Down-regulated GABAergic expression in the olfactory bulb layers of the mouse deficient in monoamine oxidase B and administered with amphetamine. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 30(4), 511-519.

Zingg H.H., Lefebvre D.L. & Almazan G. (1988). Regulation of poly (A) tail size of vasopressin mRNA. *Journal of Biological Chemistry*, 263(23), 11041-11043.

## ANEXOS

---

### **Anexo 1: Soluciones**

- **Buffer A (1 l):** 100 ml Tris-HCl pH= 7.6 + 30 ml NaCl 5 M
- **Buffer RNAsas (1 l):** 292.2 gr NaCl + 100 ml Tris-HCl pH= 8.0 + 20 ml EDTA pH=8.0.
- **EDTA 0.5 M pH=8 (500 ml):** 93.05 gr EDTA + lentejas de NaOH para ajustar pH.
- **PBS 10X (Stock):** [0.1 M PB + 9% de NaCl] Disolver 90 gr de NaCl en la cantidad necesaria de agua *in situ*, adicionar 100 ml de PB 1 M (Sigma, Cat. P3619) y aforar a 1000 ml.
- **PBT (1 l):** 100 ml de PBS 10X + 1 ml Tween 20 y aforar a 1000 ml con agua *in situ*
- **PFA (100 ml):** 4 gr de paraformaldehído + 60  $\mu$ l NaOH 10 N
- **SSC 20x (1 l):** 175.32 gr NaCl + 88.23 gr Citrato de sodio dihidratado granular.
- **TBE 10x:** 108 g Trizma base + 55 g ácido bórico + 40 ml EDTA 0.5 M pH=8.0
- **Tris-HCl pH=8.0 o pH=7.6 (1 l):** 121.1 gr Trizma base + HCl concentrado para ajustar pH.
- **Tyramida-DMSO:** 150  $\mu$ l de DMSO del kit (se debe atemperar 1 hora antes de usar) + 1 vial de Tyramida marcada con Alexa 488 del kit (vial único). Hacer alícuotas de 10  $\mu$ l y almacenar a -20°C en un vial protegido de la luz hasta su uso. Cada alícuota es útil para 16 laminillas aproximadamente.
- **Vial 3:** 200  $\mu$ l del vial 1 (buffer de amplificación) + 1  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (vial 2).
- **Vial 4 o solución de trabajo:** 297  $\mu$ l del vial 1 (o buffer de amplificación) + 3  $\mu$ l del vial 3 + 3  $\mu$ l de Tyramida-DMSO por cada 6-7 laminillas

## **Anexo 2: Material y H<sub>2</sub>O empleados en las hibridaciones *in situ* fluorescentes**

El material de vidrio que se utilizó para preparar y almacenar las soluciones para las hibridaciones *in situ* fluorescentes (en adelante FISH) se horneó a 100°C durante al menos 12 horas. El material de plástico, de madera o de vidrio sensible temperatura alta por periodos prolongados, se esterilizó por calor húmedo durante 30 minutos en una autoclave a 121°C y 15 lb/in<sup>2</sup> de presión.

Todas las soluciones utilizadas en la FISH, incluidas las empleadas para la linearización de plásmidos o la transcripción *in vitro*, se prepararon con agua milli Q, calidad tipo I (18 MΩ.cm), colectada en botellas horneadas y esterilizada por calor húmedo durante 30 minutos a 121°C y 15 lb/in<sup>2</sup> de presión (en adelante H<sub>2</sub>O-ISH). Las soluciones empleadas en todos los protocolos fueron filtradas con filtros millipore de 0.22 μm de diámetro y esterilizadas por calor húmedo antes de ser utilizadas, para eliminar la posible presencia de bacterias y/o RNAsas introducidas accidentalmente en los frascos o contenedores de los reactivos a emplear, mediante el uso de guantes contaminados durante el proceso de preparación.

**Anexo 3:** Secuencia del plásmido con número de registro NM\_017007.1 de 879 pb de la secuencia del cDNA que codifica para VGlut2, fragmento complementario de la base 522-1400.

```
1 agacagtaag gttcttttgc ttttttcct tacacaagga ttcgatgacg ttttttgta
61 atctgattaa aagacagcgg atttggttgc gttaagactt caaaaccggg aatttacgtt
121 gtttttcggt gaggtgactt ccagaacggg gactcatcag caccgccca aataccacgg
181 cactgcgcgc gccctcggcc accggatcct ccccttccaa tgagactttg tgactgtgtg
241 taccaattct cctattagga aaccctgtgg ctgaatgcag ctattccgtt gtactctctt
301 tctcgtctc cctcccctct ccaactcaca gccttgctga aaagctcatc tctgctgaga
361 agaaaacgtt ctaccttaac ctattaagac tatgvcgaga actcgccttt catagccatc
421 acaatttaaa tctggtaagg ctggacacga gtccttataa gaatggagtc ggtaaaaaaa
481 aggatttttg ccccggggaa agaggggata aagaattttg ctggaaaatc cctcggacag
541 atctacaggg tgctggagaa gaagcaggat aaccgagaga ccatcgagct gacagaggac
601 ggcaagcccc tggagggtcc tgagaagaag gctccgctat gcgactgtac gtgcttcggc
661 ctgccgcgcc gctacatcat agccatcatg agcggcctcg gcttctgcat ctcttttggc
721 atccgctgta acctgggtgt ggccattgtg gacatggta acaacagcac catccaccgg
781 ggtggcaaa ttatcaagga gaaagccaag tttaactggg accccgagac tgtgggggatg
841 attcacgggt cgttcttctg gggctatata atcacgcaga ttccgggcgg atacatcgca
901 tgcgactggt ctgctaaccg ggtctttggg gctgccatac tgcttacctc tacctcaat
961 atgctgatcc catctgcagc cagagtgcac tatggatgag tcatctttgt tagaattatg
1021 caaggacttg tggagggcgt cacctacca gcctgtcacg ggatatggag caagtgggccc
1081 cctcctttgg agaggagtag gttggctacc acctccttct gtggttccta tgcctggagca
1141 gtcatgtcaa tgcacctagc tggatctctg gtgcagtaca ctggatggtc ttcagatatt
1201 tacgtatatg gaagctttgg tatggtctgg tatatgttct ggcttctggt gtcttacgag
1261 agccccgcaa agcatccaac cataacagac gaagaacgta ggtacataga agagagcatc
1321 ggggagagcg caaatctggt aggagcaatg gagaaattca agaccccatg gaggaagttt
1381 ttcacatcca tgcctgctca tgcgataatt gttgcaaac tctgcaggag ttggactttt
1441 ttttactgct tcatcagtc accagcttat ttcgaggagg ttttttgatt tgaatcagc
1501 aaggttggca tgttgtctgc ggtcccacac ctggtcatga caatcattgt gctatcggg
1561 gggcaaatgg cagactttct aaggagcaag caaatcttct caacaactac agtgcgaaag
1621 atcatgaact gcgggggttt tggcatggaa gccacactgc ttctggttgt tggctactct
1681 catactagag ggggtggccat ctcttcttg gtgcttgacg tgggattcag tggatttgc
1741 atctctggtt tcaatgtgaa ccacttggat attgccccga gatagccag tatcttaagt
1801 ggcatttcaa atggtgttgg cacgctgtcg ggaatggtct gccgatcat tgttgggtga
1861 atgacgaaga acaagctccg tgaagaatgg cagtatgtct tctcatcgc tgcactggtc
1921 cactatggtg gagtcatatt ttatgcaacta tttgctcag gagagaagca accttgggca
1981 gacctgagg aaacaagcga agaaaagtgt ggcttcattc atgaagatga actggatgaa
2041 gaaacggggg acatcactca gaattacata aattacggta ccacaaaatc ctacggcgcc
2101 acctcacagg agaacggagg ctggcctaac ggctgggaga aaaaggaaga atttgtgcaa
2161 gaaagtgcgc aagacgcgta ctctataag gaccgagatg attattcata acgaagctag
2221 ttgctggatt cctttgtagt gtttgtgatt aaattaattg tgattgcaca aaatcatttt
2281 aagaaatgtg gtgtaaacat gtaaacacat caaccaagca agtcttgctg ttcaaaaaat
2341 aataataata tgaattcaaa acagaccgtg agagtcccat caagtgcaat ctgtggcggc
2401 agtcacgtga cgccatttcc attcaggcca ttcgtccttt tcgtttgtga ttaaaaggtt
2461 tcctgtagaa ataagtaggt attcgttggg tccatcacca cgttagagag tacaactaca
2521 acagttagca catgtcatcc tacggaagt aggaagccaa agctactgga ttatgtgaac
2581 tgcatttatt tttttattac actggactgc aaaatatccc agggaaatcc tgtctagaga
2641 catagtagaa ctgaaagat ggctagattg ggtactgacg ataatcattg tgtgtatctc
2701 atggagtggt tatatctttt aattggagaa ctatattgta tagctagcaa aattgtactg
2761 aattattact agggagtgcac agtgtgtgat attttgtgat cttccaaaag cttatcttgc
2821 agtgttttgt gaaacgcttg ggcacaaaaca cttattttta tgaacaagag cttgtaaagg
2881 gaggagtatg tccatgctc tcccattcac tacctgacag tatcaaacct tcacatttca
2941 atgaaatcca acgtccatgt aacatatcac atgacttttt ttgcaaaaaa gaatataaga
3001 agaaatagac ttcaatgtat tttttattac aactttgtac tggttgtaac ttgcattagg
3061 aaaaatgatt aatatatgta taatcgtaaa gaactaata aaaaatttact atgaagatat
3121 agcccttaaa atgcaatatt aacaacaaaa atatatagaa aatttagata atcttcttgg
3181 ataactagag actatattgga actcacacca caaagctata tataatataa aagataaac
3241 aatagagatt gtatatgtag acgattttat gacctaatgt cccatttaag aggtatttgt
3301 cttgagtata tagtacaag tatattaaaa ttatctctac atccctgtat atcttataca
3361 tatccactca cacaaacata acaaaactct ttcacacaga accaaaaaca agcatacacc
3421 taatgttggg tttggggatt gcaatttcta ctttcataga gtcatagaat ttttagatgg
3481 aaaaaaaaag gcattttgct cgtcattttc taatataatt aattcaacag gaactgcaac
3541 atttgtgtac caagcaataa gtgcgaagca taaacctgct gtgtgtaaac tatcccata
3601 ctgcttggg tagcactgat ttctttcttt taaagaactt aacatcggag ctctttacaa
3661 tgttttgcgc tgataagaat gcacatccca atttaacgca aagtgtcacc tgggtgtgtt
3721 acctgtctgt tttgggtatt tggctctggt ggtgtcctgt gctcttgact ggaggccctg
3781 ctactcgaa tataaaaact gaagtttgtt tctaaatgca aaccactcct gaccttaaga
3841 aactaaagtc cctctctgct ttgtgtctcc aagtactatc atgtgacat aacccttgc
3901 gtgctgagta aaaagatgtg aactgtcatt ttgttctgc gaagcaagt ttaataaaat
3961 gtctatttta aaaaaaaaaa aa
```

**Anexo 4:** Secuencia del plásmido (número de registro en el Gene Bank NM\_017007.1) de 535 pb que corresponde al fragmento del cDNA de la base 232-769 para GAD 67.

```

1 gaattccgaa gcagccccgg ggtgacaccc agcacgtacg tctgtggcag agcaaaagcca
61 agcggggggac gttcgcggag gagtcgcggg aggggtccagc tccctgtggc tgaatcgagc
121 ccgttctctg cccagaccg cgggggacac ttgaacagta gagaccocaa gaccaccgag
181 ctgatggcat cttccacgcc ttcgcctgca acctcctcga acgcgggagc ggatcctaata
241 actaccaacc tgcgtcctac aacatatgat acttgggtgtg gcgtagccca tggatgcacc
301 agaaaaactgg gcctgaagat ctgtggtttc ttgcaaagga ccaatagcct ggaagagaag
361 agtcgtcttg tgagcgcctt cagggagagg caggcctcca agaacctgct ttcctgtgaa
421 aacagtgacc ctggtgcccg cttccggcgc acagagacgg acttctccaa cctgtttgct
481 caagatctgc ttccagctaa gaacggggag gagcaaatg tgagttctt actggagggtg
541 gttgacatac tcctcaacta tgcgcccaag acgtttgatc gctccaccaa ggtttggagc
601 ttccaccacc cacaccagt gctggaaggc atggaaggtt ttaatttggg actgtctgac
661 caccocagat ctctggagca gatcctggtt gactgtagag acaccctaaa gtacggggtt
721 cgcacaggtc acctcgggtt tttcaaccag ctctctactg gtttggatc cattggttta
781 gctggcgaat ggctgacatc aactgccaat accaatatgt tcacatatga aattgcaccc
841 gtgtttgttc ttatggaaca gatcacactt aagaagatgc gagagatcat tggatggatca
901 aataaagatg gtgatgggat attttctcct gggggagcca tatccaacat gtacagcatc
961 atggcggctc ggtacaagta cttccagaa gtgaaaacaa aaggcatggc ggctgtgccc
1021 aaactggtc tcttcacctc agaacacagt cactattcca taaagaaggc tgggctgctg
1081 cttggctttg gaactgacaa tgtgatcctg ataaaagtga atgaaagggg gaagataatt
1141 ccagctgatt tagaggcaaa aattcttgat gccaaacaaa agggatttgt tcccctttat
1201 gtcaatgcaa ccgcaggcac gactgtttat ggagcgtttg atccgatcca ggagattgca
1261 gacatatgtg agaaatacaa cctttggctg catgtggatg ctgcctgggg tgggtgggctg
1321 ctcattgtccc ggaagcatcg ccacaaactc agcggcatag aaagggccaa ttcagtccac
1381 tggaaacctc acaagatgat ggggtgtgctg ctccagtgtt ctgccatcct ggtcaaggaa
1441 aagggtatac tccaaggatg caaccagatg tgtgcaggct acctcttcca gccagacaag
1501 cagtatgacg tctctacga tacaggggac aaggcgattc agtgtggccg ccatgtggac
1561 atcttcaagt tctggctgat gtgaaaagca aaggcactg tgggatttga aaatcagatc
1621 aacaaatgcc tggagctggc tgaatacctc tatgccaaga ttaaaaacag agaagagttt
1681 gagatggttt tcaatgggtg gcctgagcac acaaatgtct gtttctggta cataccacaa
1741 agcctccgag gggttccaga cagccctgag cgacgagaaa aactacacag ggtggctccc
1801 aagatcaaag ccctgatgat ggagtcagga acaaccatgg ttggttacca gcctcaaggg
1861 gacaaggcca acttcttccg gatggtcatc tccaaccag ccgccacca gtctgacatc
1921 gatttctca tcgaggaaat agagaggttg ggtcaagatc tgtaatcccc ccccctttgc
1981 agaaccgtaa tcaccggcca tagccctgcc cctctggcac ctagaacgc agttctgtca
2041 gtagttgaca cacctaggcc atttactga aggaattat aatctcttaa agaattttg
2101 tcacatctca cgtaagcttg tttgttagaa ttagcgggaa ataattgtct ttaaaaaaa
2161 ttgcacatta gaaacacagt atatatgtac agttatata atatatata ctctctctat
2221 gtactatgta tgtatagtga atgtggctta gtcctagacc acagcatgtc gctcgtccc
2281 agggaattag cctcaccoccc agcaattact aagaggctaa ccatctcgca agcaactgca
2341 ggacagatgg taccocccact gcagtgtcct agggaccag ggaaggccg ttgctgggag
2401 cctaccaccc tgctagagct gtccocccact gaatggatgg atgatggatg gcaggaagta
2461 ccagtagatg acaaatgtca caccctccct gttagtgcc tgctagggga tatagtagca
2521 gagtctttgt cacaattgtg ctgttgctgc gttttagaga ttaactgtg taaactgtac
2581 attaccgttg tctatctttg ggcaggggga agtgcatata atgatttaat tgtactgtcag
2641 tgagatattt gcttatttat attcaaatat atatcatggt aaagagacat cttgtatttt
2701 cttccattt gtaatgtatc ttatttatat ataatggag taagttctgg atactgttta
2761 tggatatttc gtgcatttgt gagccaaaga gaaaagatga aaattagta gacttgcatt
2821 tatatttgag tgccctaac ataattgatt gaacacatgt gtactgtctg gaaacgaatt
2881 ctgatactgt acatagatg gcgttatgga aatcttgctt cagtagcctt gctctctctc
2941 tttccoccc caggctgtac gtcagggtgt ctcaaagctt ttctagtaac tgttgaaaaa
3001 taatgactag atctcctgta atttttagt agtatatgac caatctctgt gactcgttta
3061 gctgaaacct aaggctatgt ttccgaagat ctccgataca ctgaccagtc ccacaagttg
3121 ttttgaagac atgaaaccca cactgtgcat ttagagtatg caagaagaat ataaataaaa
3181 taaaaatat tctccatgaa aaaaaaaaa aaaaaa

```