



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

SEDE SUR

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

Motivación sexual de la rata hembra en dos modelos de hiperglucemia:
Análisis de la activación de distintas áreas cerebrales

Tesis que presenta

Abigail Karina Hernández Munive

Para obtener el grado de

Doctora en ciencias

en

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Director de la tesis:

Dr. José Alonso Fernández Guasti

Ciudad de México

Agosto, 2022

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

Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de becario 587918).

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alonso Fernández Guasti, por su paciencia, apoyo y dirección en todas las etapas que tuvo esta tesis, por contribuir durante tantos años en mi formación profesional, siempre impulsándome a dar lo mejor.

A los miembros de mi sínodo: la Dra. Gabriela Rodríguez Manzo, el Dr. David Centurión Pacheco, el Dr. Gabriel Roldán Roldán y el Dr. Raúl Paredes Guerrero por todas sus valiosas aportaciones, sus comentarios, sugerencias y observaciones que sin duda contribuyeron a enriquecer el presente trabajo.

A la MC. Rebeca Reyes Serrano por su asesoría técnica y administrativa.

A Blanca Gómez Quintanar por su ayuda técnica en la realización de la inmunohistoquímica.

Al ing. José Rodolfo Fernández y a Víctor Manuel Mendoza Salas por su apoyo técnico y administrativo.

A todo el personal de vigilancia, intendencia y administrativo que labora en el departamento de farmacobiología del CINVESTAV, Unidad Sur, gracias por su loable labor

DEDICATORIA

Esta tesis esta dedicada a todas las personas que me han brindado apoyo, consejo & consuelo a lo largo de este proyecto: mi familia (mi abuelita Elia, mi mamá Mónica, mis tías -Marisela, Rosario y Verónica-, mis tíos -Guillermo y Victor-, mi hermana -Mónica- y primos -Mafer, Joy y Memo-, mi pareja -Carlos- & amigos: Beto, Adri, Nimsi, Lupita, Yarim, Fany, Mariano, etc... Gracias.

A mi Brownie, por ser ese ser que me da tanta alegría, por venir a enseñarme este amor incondicional que siempre me das, por todas esas mañanas, tardes y noches que estuviste en mi regazo esperando que terminara de escribir para ponernos a jugar, te amo.

A mis ratas, la parte fundamental de todo mi trabajo, sin ellas esta tesis no existiría. Gracias por permitirme contribuir de alguna manera a la investigación de la DM.

A la Aby de 12 años que cuando piso por primera vez un laboratorio, sintió que su vida tenía que ir por ese rumbo, lo logramos.

INDICE

INDICE DE FIGURAS	I
INDICE DE TABLAS	III
LISTA DE ABREVIATURAS	IV
RESUMEN.....	V
ABSTRACT.....	VI
I. Introducción.....	1
1.1 Diabetes mellitus	1
1.2 Diabetes mellitus tipo 1	2
1.3 Diabetes mellitus tipo 2	2
1.1.1 Criterios de diagnóstico de DM	3
1.1.2 Epidemiología.....	3
1.4 Insulina.....	4
1.5 Tratamiento para la DM.....	5
1.6 Diabetes mellitus y disfunción sexual femenina.....	6
1.7 Conducta sexual de la rata hembra	8
1.7.1 Ciclo estral.....	8
1.7.2 Receptividad.....	10
1.7.3 Motivación sexual	11
1.7.4 Conductas paracopulatorias	12
1.7.5 Conductas agresivas	12
1.7.6 Modelos utilizados para evaluar la conducta sexual femenina de la rata	13
1.8 Modelos utilizados para evaluar la motivación sexual	13
1.8.1 Cópula regulada por la hembra.....	13
1.8.2 Prueba de preferencia de pareja.....	15
1.8.3 Prueba de motivación sexual incentiva	16
1.8.4 Prueba de olfacción relativa a olores sexuales	16
1.9 Estructuras cerebrales relacionadas con la actividad sexual de la rata hembra	17
1.10 Efecto de la hiperglucemia severa y la hiperglucemia moderada sobre la	
respuesta sexual femenina	23
1.10.1 Modelos de hiperglucemia: administración de STZ.....	23
1.10.2 Hiperglucemia severa y conducta sexual	25
1.10.3 Hiperglucemia moderada y conducta sexual.....	27

1.11 Administración de STZ y expresión de c-Fos	29
II. Justificación.....	31
III. Objetivos.....	32
Objetivo general	32
Objetivos específicos	32
IV. Hipótesis.....	33
V. Materiales y métodos.	34
4.1 Sujetos experimentales	34
4.2 Diseño experimental.....	34
4.2.1 Modelos de hiperglucemia	34
Administración de STZ a ratas en la etapa adulta (hiperglucemia severa) ...	34
Administración de STZ a ratas en etapa neonatal (hiperglucemia moderada)	36
.....	36
4.2.2 Pruebas conductuales	38
- Preferencia de pareja (PP).....	38
- Motivación sexual incentiva.....	39
4.2.3 Determinación de la actividad cerebral mediante la cuantificación de c-Fos	42
.....	42
4.2.4 Análisis estadístico	45
VI. Resultados.....	46
5.1 Modelo hiperglucemia severa.....	46
5.1.1 Pruebas conductuales	47
- Prueba de preferencia de pareja	47
- Prueba de motivación sexual incentiva.	49
- Prueba de preferencia por olores sexuales.	50
- Prueba de olfacción relativa a alimentos palatables.	51
5.1.2 Determinación de la actividad cerebral mediante la cuantificación de c-Fos	52
.....	52
5.2 Modelo hiperglucemia moderada	62
5.2.1 Pruebas conductuales	63
- Prueba de preferencia de pareja	63
- Prueba de motivación sexual incentiva.	65
- Prueba de preferencia por olores sexuales.	65
- Prueba de olfacción relativa a alimentos palatables.	66

VII. Discusión.....	68
6.1 Evaluación conductual de la motivación sexual de hembras con hiperglucemia severa	68
6.1 Las hembras con hiperglucemia severa presentan una disminución en la motivación sexual.	69
6.1.1 Hipótesis: La disminución en la motivación sexual de hembras con hiperglucemia severa se debe a una alteración en la percepción de olores sexualmente relevantes	70
6.1.3 La insulina restaura la motivación sexual de hembras con hiperglucemia severa.....	71
6.1.4 Hipótesis: La disminución en la motivación sexual de hembras con hiperglucemia severa es debido a una disminución en la actividad neuronal a nivel central	73
6.2 Evaluación de la expresión de c-Fos en distintas áreas cerebrales involucradas en la motivación sexual de hembras con hiperglucemia severa.....	74
6.3 Evaluación conductual de la motivación sexual de hembras con hiperglucemia moderada.....	77
VII. Conclusiones.....	80
VIII. Perspectivas	81
IX. Referencias.....	82
X. Anexo	102

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo estral de la rata (modificado de Blaustein et al., 2008). Se muestran el incremento de estradiol y progesterona a lo largo del ciclo.	9
Figura 2.	Citología característica de cada fase del ciclo estral de la rata hembra. Modificado de Cora et al., 2015	10
Figura 3.	Diseño experimental. Administración de STZ en etapa adulta.	35
Figura 4.	Diseño experimental. Administración de STZ en etapa adulta con restitución de insulina periférica.	36
Figura 5.	Diseño experimental. Administración de STZ en la etapa neonatal.	37
Figura 6.	Arena tricompartmental donde se realiza la PP.	39
Figura 7.	Arena utilizada para la prueba de MSI.	40
Figura 8.	Arena utilizada para la prueba de olores sexuales.	41
Figura 9.	Arena utilizada para la prueba de olores/alimentos palatables.	41
Figura 10.	Tiempo acumulativo que las hembras permanecen en el compartimento donde se encuentra un macho SE o CA.	48
Figura 11.	Tiempo acumulativo que las hembras permanecieron en la zona incentivada.	50
Figura 12.	Tiempo acumulativo que las hembras permanecieron olfateando el aserrín de macho SE o CA	51
Figura 13.	Densidad de c-Fos (# células positivas/ área evaluada) en áreas cerebrales involucradas en la vía olfatoria de hembras en el modelo de hiperglucemia severa	54
Figura 14.	Fotomicrografías representativas de la activación de c-Fos en BOA de hembras tratadas con buffer o STZ sin un estímulo, frente a un macho castrado o frente a un macho experto.	57
Figura 15.	Fotomicrografías representativas de la activación de c-Fos en BNST de hembras tratadas con buffer o STZ sin un estímulo, frente a un macho castrado o frente a un macho experto.	58
Figura 16.	Fotomicrografías representativas de la activación de c-Fos en mPOA de hembras tratadas con buffer o STZ sin un estímulo, frente a un macho castrado o frente a un macho experto.	59
Figura 17.	Fotomicrografías representativas de la activación de c-Fos en VMH de hembras tratadas con buffer o STZ sin un estímulo, frente a un macho castrado o frente a un macho experto.	60
Figura 18.	Fotomicrografías representativas de la activación de c-Fos en NAcc (core) de hembras tratadas con buffer o STZ sin un estímulo, frente a un macho castrado o frente a un macho experto.	61
Figura 19.	Densidad de c-Fos (# células positivas/ área evaluada) en el NAcc (core) de hembras en el modelo de hiperglucemia severa	55

Figura 20. Curso temporal de la prueba de tolerancia a la glucosa tras la administración oral de sacarosa [2 g/kg] en animales administrados con buffer (n=28) o STZ en etapa neonatal (n=35).	62
Figura 21. Tiempo acumulativo que las hembras permanecen en el compartimento donde se encuentra un macho SE o CA. (Buffer n=8, STZ n=8).....	64
Figura 22. Tiempo acumulativo que las hembras permanecieron en la zona incentivada (Buffer n=8, STZ n=9).	65
Figura 23. Tiempo acumulativo que las hembras permanecieron olfateando el aserrín de macho SE o CA (Buffer n=6, STZ n=8).	66

INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1.</i> Comparación de los efectos de la hiperglucemia sobre la conducta sexual femenina. Las comparaciones fueron realizadas contra su respectivo grupo control tratado con buffer.....	28
<i>Tabla 2.</i> Áreas analizadas, tamaño de la estructura (mm ²), y rango antero-posterior de cada región cerebral	44
<i>Tabla 3.</i> Ganancia de peso corporal y niveles de glucosa plasmática en el modelo de hiperglucemia severa.....	46
<i>Tabla 4.</i> Conducta sexual de las hembras evaluadas (Buffer, STZ, STZ+ INS) en PP.	49
<i>Tabla 5.</i> Proporción de hembras y latencia en que las hembras desentierran el chocolate en el modelo de hiperglucemia moderada	52
<i>Tabla 6.</i> Valores de glucosa aleatoria de hembras adultas tratadas con buffer o STZ en la etapa neonatal	63
<i>Tabla 7.</i> Conducta sexual de las hembras evaluadas en la prueba de PP (Buffer, STZ).	64
<i>Tabla 8.</i> Proporción de hembras y tiempo en que las hembras en el modelo de hiperglucemia moderada encontraron el chocolate en el aserrín (buffer n=6, STZ n=10).	66
<i>Tabla 9.</i> Resumen de resultados en ambos modelos de hiperglucemia.	67

LISTA DE ABREVIATURAS

BE	Benzoato de estradiol
BSTM	Núcleo del lecho de la estría terminal
CA	Macho castrado
DAT	Transportador de dopamina
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
ER α	Receptor α estrógenos alfa
FSH	Hormona folículo estimulante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
IL	Intensidad de la lordosis
LH	Hormona luteinizante
MSI	Motivación sexual incentiva
Nacc	Núcleo accumbens
OVX	Ovariectomía
PP	Prueba de preferencia
PTGO	Prueba de tolerancia a la glucosa oral
QL	Cociente de lordosis
SE	Macho sexualmente experto
STZ	Estreptozotocina
VMH	Área ventromedial del hipotálamo

RESUMEN

El estudio de la relación entre la diabetes mellitus (DM) y la disfunción sexual femenina ha arrojado resultados controvertidos. El modelo animal más utilizado para evaluar las alteraciones de la DM es la administración de STZ, fármaco que destruye las células β pancreáticas. Cuando se administra en la edad adulta, se presentan algunos síntomas característicos de la diabetes mellitus tipo 1 (DM1): polifagia, polidipsia, poliuria, hiperglucemia severa y pérdida de peso, además de alteraciones en el ciclo estral, una reducción en la receptividad y un incremento en las conductas agresivas, cambios que son revertidos tras la administración de insulina. Cuando la STZ se administra en la etapa neonatal los animales presentan hiperglucemia moderada cuando adultas, este esquema se ha utilizado como un modelo de diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Bajo esta condición, las alteraciones en la conducta sexual son modestas (una disminución en la proceptividad y una pérdida en la conducta de regulación del ritmo de la cópula (*paced mating*)). Sin embargo, el componente motivacional de la cópula en modelos de hiperglucemia no ha sido estudiado. El objetivo de este estudio fue evaluar la motivación sexual femenina en un modelo de DM1 y en otro de DM2 en tres modelos: la prueba de preferencia de pareja (PP), la prueba de motivación sexual incentiva (MSI) y una prueba de olfacción relativa a olores sexuales (OS). También se realizó una prueba para evaluar la capacidad olfativa frente a un estímulo palatable (OP). En el modelo de DM1 a ratas Wistar OVX, se les administró STZ diluida en buffer de citratos (50 mg/kg, ip., 2 días consecutivos). Diez días después, las hembras fueron tratadas con benzoato de estradiol (BE, 10 μ g, -24h) y progesterona (3mg, -4h), sólo los animales con niveles de glucosa \geq 350 mg/dl fueron incluidos. También se incluyó un grupo administrado con insulina glargina cada 12h por 10 días (2-4U). En el modelo de DM2, hembras neonatas (3-4 días) fueron administradas con STZ (70 mg/kg, ip) o buffer de citratos. En la semana 8, se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa y fueron incluidas en el estudio las hembras con valores de glucosa \geq 250 mg/dl 60 minutos después del reto de sacarosa. Las pruebas conductuales fueron realizadas en la semana 12, cuando las hembras estaban en la fase de proestro. Para PP registramos el tiempo en cada compartimento y la conducta sexual. En MSI calculamos el tiempo que la hembra permanece en cada zona incentiva, en OS evaluamos el tiempo que las hembras olfatean el aserrín de los diferentes estímulos. En las tres pruebas, un macho castrado y un macho sexualmente experto fueron utilizados como estímulos o aserrín proveniente de su caja de alojamiento. En OP evaluamos la latencia que le tomó a la hembra encontrar un pequeño trozo de chocolate oculto en el aserrín. Las ratas OVX tratadas con STZ en la etapa adulta no ganaron peso corporal y presentaron un incremento en los niveles de glucosa en sangre. En la prueba de PP, las hembras control pasaron más tiempo con un macho sexualmente experto, mientras que las hembras con hiperglucemia severa permanecieron el mismo tiempo con el macho castrado y sexualmente experto. De igual forma, en la arena de MSI, las hembras control pasaron más tiempo en la zona del incentivo sexual, mientras que las tratadas con STZ permanecieron el mismo tiempo en la vecindad de ambos estímulos; en OS las hembras con hiperglucemia severa no presentaron una diferencia en el tiempo de olfateo entre ambos aserrines. No hubo diferencia en las latencias de las hembras-STZ y control para encontrar el chocolate escondido. Todos estos cambios (en PP, ISM, OS) se revirtieron con la administración de insulina a valores comparables a los del grupo control. En el modelo DM2 no observamos cambios con respecto al control en las pruebas PP, OS y OP, sólo se encontró una disminución en el tiempo que la hembra permanece en la vecindad del macho experto en la prueba de MSI. Finalmente, en hembras con hiperglucemia severa determinamos la actividad cerebral -evaluada por la expresión de la proteína c-Fos- en diversas áreas de la vía olfatoria accesoria (bulbo olfatorio accesorio, área preóptica media del hipotálamo, núcleo de la base de la estría terminal, núcleo ventromedial del hipotálamo), y en el núcleo accumbens (área relacionada con la motivación sexual). La hiperglucemia severa disminuyó la expresión de c-Fos en todas las áreas cerebrales evaluadas, independientemente del estímulo presentado.

ABSTRACT

The relationship between diabetes mellitus (DM) and sexual dysfunction in women has shown controversial results. The animal model most used to study DM effect is streptozotocin administration (STZ), a drug that destroys β -pancreatic cells. When STZ is administered in the adult stage, the animal shows some symptoms of DM1: polyphagia, polydipsia, polyuria, severe hyperglycemia, and weight lost, also it has been reported that females treated with STZ showed altered estrous cycle, a reduction in sexual receptivity and increased aggressiveness, changes that were reverted with exogenous insulin. When STZ is administered in the neonatal stage, the rat shows mild hyperglycemia in adulthood resembling a DM2 model. The alterations of sexual behavior in this model are less severe than after STZ treatment in adulthood (diminished proceptivity and loss of paced mating behavior). However, the motivational component of copulation in hyperglycemic rats has not been systematically studied. The aim of this study was to evaluate female sexual motivation (FSM) in a model of DM1 and DM2 in three behavioral models: the partner preference (PP), the incentive sexual motivation (ISM) and the olfaction relative to sexual odors (OTS) tests. We also tested the olfactory capacity to detect odors from edible food (OTP). DM1 was modeled in OVX Wistar rats by injecting STZ diluted in citrate buffer [50 mg/kg, i.p., for 2 consecutive days]. Ten days later, female rats were treated with estradiol benzoate (10 mg, -24 h) and progesterone (3 mg, -4 h). Only animals with blood glucose values ≥ 350 mg/dl were considered in the study. Also, a group of STZ-treated animals were administered with a long-acting insulin analogue (glargine) every 12 hours for 10 days (2-4U). In the DM2 model, neonatal females (3-4 days) were administered with streptozotocin (STZ, 70 mg/kg, intraperitoneally) or citrate buffer. At week 8, a glucose tolerance test was performed, females with blood glucose levels ≥ 250 mg/dl 60 minutes after a glucose load were considered for the study. Behavioral tests were conducted at week 12, when the females were in proestrus. For PP we registered the time in each compartment and the sexual behavior. In the ISM test, we calculated the time the females remained in each incentive zone; in OTS we evaluated the time the females spent sniffing the sawdust coming from different stimuli. In the three tests, a castrated male and a sexually experienced male were used as stimuli or the sawdust from the box where they lived. In the OTP, we evaluated the latency required by the female to find a small piece of chocolate. Adult-treated STZ-OVX rats lost body weight and had increased blood glucose levels. In the PP test, control females spent more time with a sexually experienced male, while the severe hyperglycemic females stayed the same amount of time with the castrated and the sexually experienced males. Similarly, in the ISM arena, control females spent more time in the incentive zone of the sexually active males, while the females treated with STZ remained the same amount of time in the vicinity of both stimuli. In OTS, the STZ-treated females showed no difference in the sniffing time between both sawdust. Finally, there was no difference between STZ and control females in the time to find the hidden chocolate. All these changes (in PP, ISM, OTS) were reversed by chronic insulin treatment to values comparable to those of the control group. In the DM2 model we only found a decrease in the time that the STZ-treated females remain in the vicinity of the sexually expert male evaluated in ISM; in the PP, OTS and OPT no changes occurred. In a last experiment we analyzed the brain activity -evaluated by the expression of c-Fos- in severe hyperglycemic females in various brain areas of the accessory olfactory tract (accessory olfactory bulb, median preoptic area of the hypothalamus, bed nucleus of the stria terminalis, ventromedial nucleus of the hypothalamus) and in the nucleus accumbens (area related to sexual motivation). Severe hyperglycemia decreased c-Fos expression in all brain areas regardless of the stimuli presented.

I. Introducción

1.1 Diabetes mellitus

Según la Asociación Americana de Diabetes, la diabetes mellitus (DM) es: “un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia crónica resultante de defectos en la secreción de insulina, la acción de la insulina o ambas” (American Diabetes Association, 2022). Los síntomas característicos de esta enfermedad incluyen poliuria, polidipsia, polifagia y pérdida de peso, visión borrosa etc., e incluso, si la diabetes no es controlada, pueden presentarse complicaciones a largo plazo, como un aumento en la susceptibilidad a ciertas infecciones, nefropatía (que conduce a insuficiencia renal); neuropatía periférica (con riesgo de úlceras de pie) y neuropatía autonómica que causa trastornos gastrointestinales, genitourinarios, síntomas cardiovasculares y disfunción sexual o dolor crónico (Tripathi et al., 2016).

Diversos procesos están involucrados en el desarrollo de la DM que van desde la destrucción autoinmune de las células β del páncreas, con la consecuente deficiencia en la secreción de insulina (fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 1 –DM1-) (Gillespie, 2006) hasta una disminución en la acción de la insulina en diversos órganos diana o una secreción inadecuada de esta hormona (como ocurre en la diabetes mellitus tipo 2 -DM2-) (Chatterjee et al., 2017). La gran mayoría de los casos de DM a nivel mundial entran en estas dos categorías etiopatogénicas: pacientes con DM1 abarcan alrededor del 5-10% de la población con DM y pacientes con DM2, con un porcentaje superior al 90% cabe señalar que existe un estado llamado prediabetes, en el cual los niveles de glucosa en la sangre son más altos (100-125 mg/dl en ayunas) que lo normal (90 mg/dl en ayunas), pero aún no lo suficientemente altos como para un diagnóstico de DM2; sin embargo, la prediabetes aumenta el riesgo de padecer DM2, enfermedad del corazón y derrame cerebral (OMS, 2016).

Existen otros tipos de diabetes como la diabetes gestacional y el tipo 3A, 3B, 3C (American Diabetes Association, 2022), que se presentan en menor porcentaje en la población. Cada uno de estos tipos de DM tiene características particulares, en los siguientes apartados hablaremos de las características de la DM1 y DM2.

1.2 Diabetes mellitus tipo 1

Anteriormente nombrada diabetes insulino dependiente o diabetes de inicio juvenil es el resultado de una destrucción autoinmune de las células β del páncreas con la consecuente ausencia en la secreción de insulina. En este tipo de diabetes la tasa de la destrucción de células β pancreáticas es variable, siendo rápida en algunos individuos (principalmente bebés y niños) y lento en otros (principalmente adultos). Existen algunos factores de riesgo para el desarrollo de la DM1 como la edad, el sexo, el genotipo. El tratamiento de elección para su manejo es la administración diaria de insulina con cada alimento o cuando se pierde la normoglucemia (>140 mg/dl, 2 h posprandial) (Atkinson et al., 2014).

1.3 Diabetes mellitus tipo 2

La DM2 también era conocida como diabetes no insulino dependiente o diabetes de inicio en la edad adulta. Se puede presentar debido a: una resistencia a las acciones de la insulina en los tejidos periféricos: músculo, hígado, etc. Esta deficiencia en la señalización de la insulina puede ser debida a diversos factores como mutaciones y/o modificaciones postraduccionales del receptor a insulina, o de algunas moléculas efectoras cascada abajo o a una deficiencia relativa de la secreción de insulina por parte del páncreas (en lugar de una deficiencia absoluta como en el caso de la DM1) (Tan et al., 2019). Este tipo de DM con frecuencia no se diagnostica durante muchos años y el riesgo de desarrollar esta forma de diabetes aumenta con la edad, la obesidad y la falta de actividad física. La resistencia a la insulina puede mejorar con la reducción de peso y / o el tratamiento farmacológico para la hiperglucemia

(hipoglucemiantes orales como las sulfonilureas, biguadinas glitazonas) (Ayala et al., 2002), pero rara vez se normaliza.

1.1.1 Criterios de diagnóstico de DM

Durante décadas el diagnóstico de diabetes se ha basado en evaluar los niveles de glucosa en sangre, a través de distintas pruebas entre las que se encuentran:

1. La prueba de A1c, que también se conoce como prueba de hemoglobina A1c o HbA1c. Es una prueba de sangre que mide el promedio de los niveles de glucosa en la sangre de los últimos tres meses, se usa comúnmente para diagnosticar la prediabetes y la diabetes, y es también la prueba principal que ayuda a manejar la diabetes. Valores de A1c entre 5.7% a 6.4% indican que el paciente se encuentra en prediabetes, mientras que valores $\geq 6.5\%$ se consideran positivos a DM.
2. Toma de glucosa en ayunas ≥ 126 mg/dl (ayuno de al menos 8 h).
3. Prueba de tolerancia a la glucosa, se considera positiva cuando los valores ≥ 200 mg/dl 2 h después de la ingesta de una solución de sacarosa de 75 g, esta prueba indica como el organismo procesa el consumo de azúcar.
4. En pacientes con síntomas como polifagia, poliuria, polidipsia, se puede tomar la glucosa aleatoria (en cualquier momento del día) y se considera positiva cuando los valores de glucosa sanguínea son ≥ 200 mg/dl (OMS, 2016)

1.1.2 Epidemiología

A nivel mundial se calcula que existen 463 millones de personas que padecen algún tipo de DM. La Federación Internacional de Diabetes (FID) estima que

entre un 87-91% de los pacientes con diabetes, tienen DM2, del 4-12% tienen DM1 y del 1-3% tienen otros tipos de diabetes (International Diabetes Federation, 2019).

México ocupa el sexto lugar a nivel mundial en presentar el mayor número de pacientes con DM, encontrándose como una de las principales causas de muerte entre la población, teniendo una prevalencia mayor en mujeres que en hombres (10.3 vs. 8.4%) (Secretaría de Salud, 2016).

1.4 Insulina

La insulina es una hormona proteica producida por las células β de los islotes de Langerhans del páncreas -bajo la influencia de los niveles de glucosa en sangre-, para posteriormente pasar al torrente sanguíneo y a través de la circulación alcanzar los diversos órganos diana. A nivel celular, la insulina interactúa con su receptor de superficie celular llamado receptor de insulina (RI) (de Meyts, 2004).

Esta interacción estimula una cascada de señalizaciones intracelulares, cada una catalizada por una enzima diferente, que finalmente da como resultado la producción de otra proteína: el transportador de glucosa (GLUT4 en las células musculares). El transportador GLUT4 pasa o migra a la superficie celular facilitando la entrada a las células de nutrientes moleculares más grandes como la glucosa. La insulina tiene varias funciones en diferentes células: facilita la absorción y almacenamiento de los componentes de los alimentos en las células, estimula las enzimas que producen glucógeno y grasa, entre otras (Lee & Pilch, 1994).

En ausencia de insulina (como ocurren en la DM), el organismo no puede utilizar los metabolitos producidos y se crea un estado catabólico. El hígado también puede producir nueva glucosa (gluconeogénesis) a partir de proteínas y, en menor medida del glicerol producido en la descomposición de las grasas. La producción de glucosa por el hígado es uno de los procesos más

importantes que resultan en la hiperglucemia en la DM, ya sea por deficiencia de insulina o por resistencia a la insulina (Guthrie & Guthrie, 2004).

1.5 Tratamiento para la DM

El tratamiento de elección depende de la etiología de la enfermedad. La insulina humana es el medicamento de primera línea para pacientes con DM1. Existen diversos tipos de insulina disponibles en el mercado:

- a) Insulina de acción rápida que posee una farmacocinética similar a la de la insulina humana, tienen un inicio de acción de 5-15 minutos con un pico de efecto de 1-2 horas después de la administración, la duración del efecto es de alrededor de 4 a 6 horas.
- b) Insulina de acción intermedia, tiene un inicio de acción de 1 a 2 horas post administración, un pico de acción máximo a las 4 horas. El efecto antihiperglucemiante es de 12 horas.
- c) Insulina de acción prolongada (acción ultra lenta): el efecto se presenta 1 ½ - 2 h después de ser administrada con una duración del efecto relativamente larga (24 horas) (Gómez Ayala, 2008). En este trabajo se utilizó un análogo de insulina (insulina glargina) de acción prolongada.

Para el tratamiento de la DM2, se recomienda iniciar con una estrategia no farmacológica: pidiéndole al paciente que se alimente de manera balanceada y realizando ejercicio con regularidad (Wei et al., 2018). En caso de que la enfermedad evolucione es necesario utilizar algunos fármacos hipoglucemiantes como las sulfonilureas (gliburida), las biguadinas (siendo la metformina la más utilizada) y las tiazolidinedionas (rosiglitazona); la elección del tratamiento dependerá de distintos factores como: el costo, los efectos adversos, la eficacia en mantener la normoglucemia y el apego al esquema de administración. En caso de que estos medicamentos sean insuficientes para regular los niveles de glucosa sanguínea será necesario administrar insulina, ya sea como monoterapia o en combinación con los hipoglucemiantes (Kleinberger & Pollin, 2015; Tan et al., 2019).

1.6 Diabetes mellitus y disfunción sexual femenina

Como hemos mencionado, la DM está asociada con diversas complicaciones; entre las menos estudiadas se encuentra el impacto que tiene dicha enfermedad sobre la vida sexual de la mujer. Las disfunciones sexuales se definen como: “un grupo de trastornos caracterizados por una alteración en la capacidad de una persona de responder sexualmente o experimentar placer sexual” (Clay, 2009). Es importante señalar que un individuo puede presentar diversas disfunciones sexuales al mismo tiempo.

Los estudios publicados sobre la relación que existe entre la DM y la disfunción sexual femenina son inconsistentes, debido a que en muchos de ellos no se consideran factores importantes para el análisis como la distinción entre el tipo de DM que presenta la paciente, si está bajo algún tratamiento para el control glucémico, la presencia de otras comorbilidades, el tiempo que la paciente ha vivido con la enfermedad e incluso su condición endocrina (inicio de la adolescencia, pre o post menopausia etc.). Sin embargo, la mayoría de los reportes dejan claro que la DM tiene un impacto deletéreo sobre varios aspectos de la función sexual de la paciente (Bargiota et al., 2011; Homko & Trout, 2006; Newman & Bertelson, 1986; Nowosielski et al., 2010). Por ejemplo, un grupo de pacientes con DM1, además de mostrar alteraciones en la regularidad del ciclo menstrual (oligomenorreas o amenorreas), reportó presentar un deterioro en el control de la glucemia cerca de la menstruación, mientras que otras observan una mejoría en esta etapa. El mecanismo mediante el cual se lleva a cabo este ajuste homeostático aún no está elucidado completamente, pero se cree que se debe a los cambios en los niveles de estrógenos y progesterona ocurridos durante el ciclo menstrual (Doruk et al., 2005).

De igual forma, existen algunas comorbilidades asociadas a la DM, por ejemplo, mujeres con problemas psicológicos, como la depresión, presentan un decremento en la lubricación vaginal y una disminución en la libido (Homko & Trout, 2006; Nowosielski et al., 2016). Otra de las comorbilidades más

frecuentes en pacientes con DM es la neuropatía diabética (la cual provoca daño a los nervios); algunas pacientes que presentan dicha patología reportan tener dolor durante el encuentro sexual, menor actividad sexual, así como una disminución en el deseo (Gómora et al., 1994).

Uno de los aspectos de la conducta sexual más difíciles de estudiar ha sido las fases que preceden a la cópula como el deseo y la excitación sexual (no sólo en pacientes con DM). Un estudio realizado por el grupo de Wincze (1993) en el que se evaluaba la excitación sexual a través del flujo vaginal frente a un estímulo erótico, demostró que las pacientes con DM presentaron una disminución en la respuesta cuando se comparó con un grupo normoglucémico; sin embargo, en la excitación “subjetiva” (o deseo) parecía no existir diferencia entre ambos grupos (evaluación realizada a través de un cuestionario) (Wincze et al., 1993). Resultados similares, fueron reportados en otro grupo de pacientes con DM1 y neuropatía, quienes mostraron una disminución en la sensación del clítoris (tenían un umbral más alto de respuesta ante un estímulo vibratorio) sin afectar el deseo sexual (también evaluado mediante un cuestionario) (Both et al., 2015) . Estos datos invitan a pensar, que, a diferencia de los varones, la retroalimentación periférica de la excitación genital parece ser un determinante relativamente poco importante de la excitación sexual subjetiva en las mujeres (Giraldi & Kristensen, 2010).

Sin embargo, existen otros estudios en los que se reportó una disminución en el deseo sexual evaluado a través de cuestionarios a pacientes con DM1 (Doruk et al., 2005; Enzlin et al., 2002) con DM2 (Bal et al., 2015; Erol et al., 2002; Fatemi & Taghavi, 2009; Mezones-Holguin et al., 2008) o sin hacer distinción del tipo de DM (Campbell et al., 1989; Rockliffe-Fidler & Kiemle, 2003). Estas discrepancias encontradas en la literatura permiten preguntarnos qué es lo que pasa en realidad con esta fase de la respuesta sexual en mujeres con DM.

Muchos de los estudios mecanísticos necesarios para la comprensión de los procesos fisiológicos involucrados en la respuesta sexual no pueden realizarse directamente en seres humanos. Por ello, los modelos animales han sido utilizados ampliamente en la investigación, siendo la rata el animal más usado en el estudio del comportamiento sexual (Holder & Mong, 2017).

1.7 Conducta sexual de la rata hembra

Tradicionalmente, la conducta sexual de la rata hembra se ha clasificado en atracción, proceptividad (comportamientos apetitivos que preceden a la cópula) y la conducta consumatoria (llamada lordosis), respuestas que sólo se presentan cuando la hembra se encuentra en la fase de proestro (Beach, 1976). La mayoría de las investigaciones que evalúan la respuesta sexual femenina se han centrado en el estudio de la lordosis, dejando de lado las conductas que preceden a esta respuesta. A continuación, se abordará con mayor detalle cada uno de los aspectos de la cópula y se explicará el ciclo estral de la rata.

1.7.1 Ciclo estral

El ciclo estral o ciclo reproductivo de la rata hembra tiene una duración de 4-5 días (aproximadamente) y está compuesto de 4 fases: proestro (duración 14h), estro (24-48h), metaestro (6-8h) y diestro (48-72h); cada fase refleja los cambios neuroendocrinos ocurridos en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Hubscher et al., 2005; Marcondes et al., 2002).

El inicio del ciclo se da con el incremento de los niveles de estradiol (figura 1), hormona que, por un mecanismo de retroalimentación negativa, amplifica la liberación pulsátil de GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas) en el hipotálamo. Esta hormona a su vez estimula la secreción de FSH (hormona folículo estimulante) y de LH (hormona luteinizante). El incremento en FSH estimula el crecimiento y el reclutamiento de los folículos inmaduros en el ovario y promueve la síntesis de estradiol, que ejerce una retroalimentación positiva sobre la secreción de LH. El pico en la concentración de LH produce un incremento en la secreción de progesterona (P₄); ambos fenómenos

provocan la ovulación (fase de proestro) y, en caso de que no se establezca el embarazo, los niveles hormonales regresan a valores basales en la fase de diestro (Blaustein, 2008; Goldman et al., 2007).

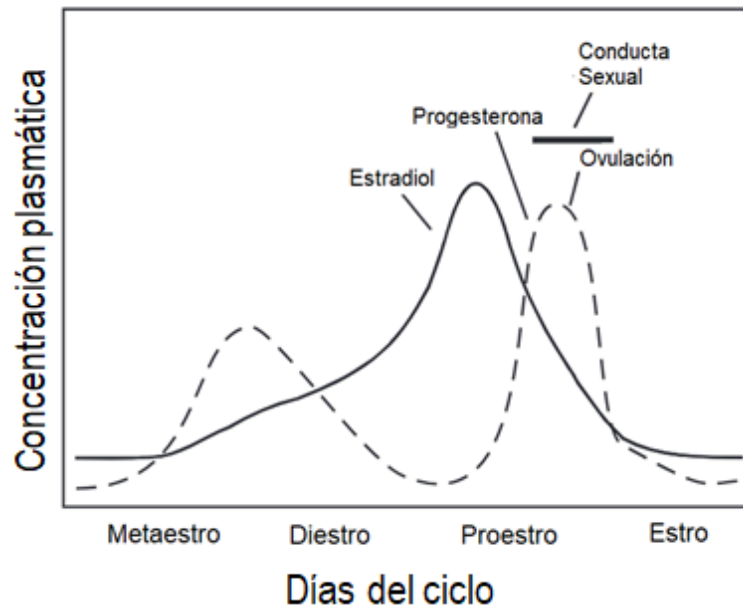


Figura 1. Ciclo estral de la rata (modificado de Blaustein et al., 2008). Se muestran el incremento de estradiol y progesterona a lo largo del ciclo.

Cada una de las fases del ciclo estral puede diferenciarse mediante la citología vaginal (fig 2), ya que se puede observar un aumento, disminución o proporción diferencial de distintos tipos celulares: células epiteliales, células cornificadas y leucocitos (Marcondes et al., 2002). La citología característica de cada fase es la siguiente:

- a) Proestro: aumento de células epiteliales nucleadas
- b) Estro: presencia de células cornificadas sin núcleo.
- c) Metaestro: se encuentra la misma proporción de leucocitos, células cornificadas y células epiteliales nucleadas
- d) Diestro: se presenta una mayor cantidad de leucocitos (Cora et al., 2015).

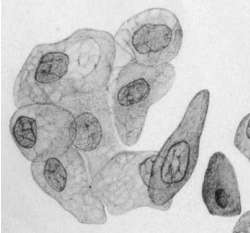
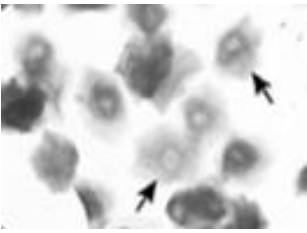
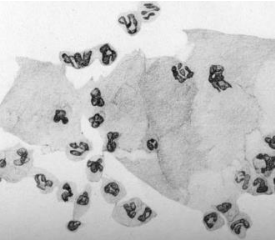
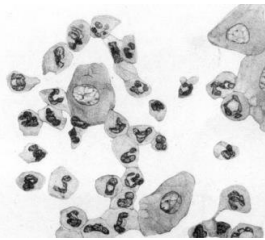
	
Proestro	Estro
	
Metaestro	Diestro

Figura 2. Citología característica de cada fase del ciclo estral de la rata hembra. (Modificado de Cora et al., 2015).

La conducta sexual en los roedores sólo tiene un objetivo biológico asociado con la reproducción y, en esa medida, ocurre en las hembras alrededor de la ovulación (ver fig. 1). Para su análisis la conducta sexual de la rata hembra puede dividirse en diversos componentes:

1.7.2 Receptividad

La conducta receptiva, también llamada lordosis, se define como la dorsiflexión de la columna vertebral como respuesta refleja ante la estimulación de los flancos traseros provocados por la monta del macho, esta dorsiflexión se caracteriza por la elevación de la cabeza y de la grupa, con desviación de la cola para permitir la penetración vaginal (Erskine, 1989). De manera cuantitativa, esta conducta es evaluada a través del cociente de lordosis [QL (número de lordosis / número de montas x 100) y la intensidad de la lordosis [IL], evaluada en una escala de 0-3, dependiendo del grado de dorsiflexión presentado. Cabe mencionar que la conducta de lordosis se ha asociado con el aspecto consumatorio de la cópula (Blaustein & Erskine, 2002).

1.7.3 Motivación sexual

Al igual que la conducta consumatoria, la motivación sexual en la rata hembra varía dependiendo de la fase del ciclo estral en la que se encuentre el animal (se produce sólo en la fase de proestro tardío), y está modulada por las hormonas gonadales estradiol y progesterona. Este estado hormonal produce una motivación (no aprendida) de la búsqueda de una pareja sexual (Nofrey et al., 2008), y se ha demostrado que uno de los principales sentidos involucrados en esta búsqueda es la olfacción, específicamente el sistema olfativo accesorio (Saito et al., 1999). Así, las hembras en proestro prefieren olfatear el aserrín impregnado con olores de un macho administrado con altas dosis de testosterona o de un macho con experiencia sexual previa, que el aserrín de machos castrados (Taylor et al., 1982).

La motivación sexual consta de dos componentes básicos: el estado de motivación central y el incentivo. El estado de motivación central es definido como la serie de procesos que promueven las acciones directas en el cerebro del animal para conseguir un objetivo y el incentivo puede ser cualquier estímulo con propiedades recompensantes (Ågmo, 2011). Se cree que el estado de motivación central se integra, al menos parcialmente, en el área preóptica media del hipotálamo (mPOA) (Ågmo, 1999), por lo cual se le señala como un área importante en el estudio del aspecto apetitivo de la cópula. Un estímulo eficiente no sólo puede generar actividad a nivel sistémico (como la activación muscular para realizar alguna conducta), también puede alterar la actividad en el sistema nervioso autónomo y el sistema endocrino (Ågmo, 2014).

Podemos evaluar la motivación sexual a través de la cuantificación de conductas específicas, como las conductas paracopulatorias, o mediante la evaluación del trabajo/esfuerzo que realiza el sujeto experimental para acceder a la oportunidad de copular, ya sea enseñándolo a presionar una palanca, a cruzar cercas electrificadas o introduciendo su nariz por orificios para acceder al estímulo; sin embargo, la mayoría de estas pruebas requiere

del aprendizaje o la destreza del animal (Avitsur & Yirmiya, 1999). Existen otras pruebas en las que se permite que el roedor presente, de manera natural, algunas conductas de acercamiento. Por ejemplo, la cópula regulada por la hembra, prueba de preferencia de pareja, la prueba de motivación sexual incentiva, la prueba de olfacción relativa a olores sexuales (Paredes, 2009). En los siguientes apartados se dará mayor detalle de cada una de estas pruebas, aunque su definición metodológica se hará en la sección correspondiente.

1.7.4 Conductas paracopulatorias

Las conductas paracopulatorias o conductas proceptivas son conductas especie-específicas que denotan la disposición de la hembra para iniciar/continuar la cópula. Entre estas conductas se encuentran el orejeo (movimiento rápido de la cabeza que produce el aleteo fino de las orejas), el brincoteo (pequeños saltos con las cuatro extremidades extendidas) y el zigzagueo (carreras cortas que realiza la hembra a lo largo de la arena con cambios abruptos de dirección) (Bergheim et al., 2015). Algunos autores consideran que estas conductas son un reflejo de la motivación sexual (Beach, 1976; Snoeren et al., 2011).

1.7.5 Conductas agresivas

Al contrario de las conductas proceptivas, las conductas agresivas o de rechazo son consideradas como un indicador negativo de la motivación sexual femenina. Generalmente las conductas de rechazo se presentan cuando la hembra no se encuentra receptiva o tras largos periodos de cópula, en un intento de regular la interacción sexual (Erskine, 1989). Entre las conductas agresivas presentadas por la hembra durante la cópula podemos mencionar: *boxing* (se presenta cuando la hembra empuja al macho con sus patas delanteras), mordidas (observadas cuando la hembra ataca al macho mordiéndolo de frente o lateralmente, sin dañarlo), la postura ofensiva lateral (pataleo al macho con las patas traseras) y vocalizaciones (Madlafousek & Hlinak, 2012).

Se ha reportado un incremento en las conductas de rechazo cuando la hembra no regula el ritmo de la interacción sexual, como ocurre en el modelo de cópula no regulada por la hembra (Hernández-Munive et al., 2020).

1.7.6 Modelos utilizados para evaluar la conducta sexual femenina de la rata

a) Cópula no regulada por la hembra

En esta prueba los animales (hembra y macho) son colocados en una arena circular y el macho es el que determina el ritmo de la cópula, lo cual, incrementa las conductas de rechazo por parte de la hembra (Coopersmith et al., 1996). A pesar de que es la arena más frecuentemente utilizada para evaluar la respuesta sexual femenina en ratas, no resulta adecuada para evaluar los aspectos motivacionales de la cópula en la hembra, ya que la conducta desplegada con esta temporalidad no es reforzante para ella (Paredes & Vazquez, 1999).

1.8 Modelos utilizados para evaluar la motivación sexual

1.8.1 Cópula regulada por la hembra

Esta prueba se realiza en una caja de dos compartimentos separados por una pared de acrílico con dos orificios pequeños en la parte inferior, por lo cuales sólo la hembra puede pasar libremente, ya que es de menor tamaño que el macho. En esta prueba se pueden diferenciar dos factores importantes de la cópula:

- 1) El componente sensorial de la cópula. La hembra puede diferenciar entre el tipo de estimulación que está recibiendo ya sea de una monta, de una intromisión o de una eyaculación. Esto se ve reflejado en el porcentaje de salidas que realiza la hembra después de cada una de estas conductas emitidas por el macho.

Es decir, existe un porcentaje de salidas mayor si la hembra recibe una eyaculación a que si recibe una monta.

- 2) El componente motivacional de la cópula: entendido como la disposición de la hembra para continuar con la interacción sexual. Esto se puede evaluar mediante las latencias de retorno al compartimento donde se encuentra el macho después de presentar una salida post estimulación (Coopersmith et al., 1996; Zipse et al., 2000). Se ha observado que las latencias de retorno al compartimento donde se encuentra el macho son mayores después de una eyaculación, seguidas de las que ocurren después de una intromisión y más breves después de una monta, hipotetizando que a mayor estimulación vagino-cervical le toma más tiempo a la hembra regresar a interactuar sexualmente con el macho (Paredes & Vazquez, 1999).

Se ha reportado que el que la hembra regule la interacción sexual genera distintas respuestas fisiológicas, por ejemplo, un incremento en el número de crías por camada, un aumento en los niveles de LH y un mayor número de conductas proceptivas (Coopersmith et al., 1996). Sólo cuando la hembra establece el control de la estimulación sexual que recibe, la cópula se torna reforzante para ella e induce un estado de recompensa (Paredes & Alonso, 1997). En este modelo podemos evaluar tanto el componente consumatorio de la cópula como el aspecto motivacional.

Existen otros modelos en los que se puede evaluar el acercamiento a un estímulo sexual o social, ya sea teniendo libre acceso, limitando el contacto físico o permitiendo el acercamiento a través de las señales olfativas que el estímulo emite.

1.8.2 Prueba de preferencia de pareja

En esta prueba, las hembras pueden elegir entre interactuar con un macho sexualmente experto (SE), es decir, aquel que tuvo experiencia sexual previa (ver metodología) o un macho castrado (CA). Se realiza en una arena tricompartmental, en la que los estímulos se encuentran en lados contrarios de la caja sujetos por un arnés, la hembra es la única que puede deambular libremente entre los compartimentos. En esta prueba se puede evaluar el aspecto consumatorio, cociente de lordosis (QL) e intensidad de la lordosis (IL), y el apetitivo, a través del tiempo de permanencia con cada estímulo, de la conducta sexual (Brand & Slob, 1991). Se sabe que el incentivo sexual será elegido por dos razones: para buscar un compañero sexual y/o por un encuentro social; en cambio, el incentivo social sólo es buscado de forma social. La diferencia entre los tiempos de permanencia entre ambos deberá entonces representar la intensidad de la búsqueda de una pareja sexual (Ágmo et al., 2004). Esta prueba tiene la característica de permitir el contacto físico del animal experimental (la hembra) con los estímulos (macho sexualmente experto o macho castrado). Experimentalmente este contacto físico puede considerarse una ventaja del modelo debido a que el animal puede recibir toda la información sensorial que acompaña a la cópula tal y como sucede en la naturaleza; sin embargo, también puede considerarse una desventaja al momento de evaluar únicamente la motivación sexual, ya que como resultado de la interacción física el animal experimental puede abandonar la zona del estímulo y modificar el tiempo total de permanencia, por ejemplo durante el periodo posteyaculatorio (Broekman et al., 1988; Clark et al., 2004; Ferreira-Nuño et al., 2005). Con base en ello, algunos autores (Ágmo, 2003; Paredes, 2009; Ventura-Aquino & Paredes, 2016) han propuesto el uso de pruebas de motivación que eviten el contacto físico, como la prueba de motivación sexual incentiva para evaluar de forma más específica el interés de la hembra por copular.

1.8.3 Prueba de motivación sexual incentiva

La evaluación de la motivación sexual incentiva se realiza en una arena que tiene dos compartimentos adyacentes donde se colocan los sujetos incentivos (macho SE o CA), en lados opuestos de la arena. El sujeto experimental y el sujeto incentivo están separados por una malla a través de la cual sólo se pueden ver, oler y escuchar entre ellos, lo que permite evaluar de manera específica, el componente apetitivo de la cópula. El área adyacente al compartimento donde se encuentra el animal estímulo es llamada zona incentiva. Cuando la hembra permanece más tiempo en la vecindad de un macho sexualmente experto vs. el tiempo invertido junto al macho castrado, se considera que la hembra tiene mayor motivación sexual (Ågmo, 1999) la descripción detallada del método a seguir con esta prueba será descrito en la sección 4.2. Esta prueba tiene la ventaja de que, al limitar el contacto físico, la motivación sexual de la hembra no queda enmascarada por la cópula misma que posee aspectos retribuyentes y aversivos (Ventura-Aquino & Paredes, 2016).

1.8.4 Prueba de olfacción relativa a olores sexuales

Diversos estudios han demostrado que las señales olfativas emitidas por los animales estímulo están involucradas en la selección de la pareja (Edwards et al., 1996; Petrusis et al., 1999), por lo cual, un modelo como el de la prueba de olfacción relativa a olores sexuales, provee la ventaja de presentar un estímulo altamente relevante para el roedor, sin la influencia de otros estímulos sensoriales (visual/auditivo/contacto físico con los estímulos).

En esta prueba, comúnmente se le presenta al sujeto experimental aserrín proveniente de la caja donde habitaron los animales estímulo y que tiene impregnado distintos olores, característicos del animal (Taylor et al., 1982). En ella, las hembras en proestro prefieren olfatear el aserrín impregnado con orina de machos con experiencia sexual *versus* el aserrín con orina de machos castrados (Halpern & Martínez-Marcos, 2003).

1.9 Estructuras cerebrales relacionadas con la actividad sexual de la rata hembra

La conducta sexual, como cualquier otra, se integra en el SNC. Existen varias maneras de analizar los cambios a nivel cerebral producidos por la actividad sexual, incluidos los aspectos motivacionales de la cópula. En animales de laboratorio, uno de los más utilizados es la inmunohistoquímica para c-Fos que se describirá a continuación.

La respuesta sexual de la rata hembra es dependiente de las concentraciones de hormonas ováricas. La estimulación somatosensorial de los flancos y de la grupa, provoca potenciales de acción que viajan a través de los nervios periféricos hacia la médula espinal, dichas señales ascienden por las vías espino-reticular y espino-talámica, para formar el bucle espino-tálamo-médula espinal, cuya actividad está controlada por señales dependientes de estrógenos de las neuronas en el núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH) que expresan gran cantidad del receptor a estrógenos α (ER α) (Spiteri et al., 2012). Posteriormente, se activan las neuronas (mediante una despolarización del potencial de acción transitorio) en la sustancia gris mesencefálica, cuyas neuronas a su vez activarán a las neuronas del tracto retículoespinal y vestibuloespinal. Finalmente se activarán las neuronas motoras de los músculos axiales profundos de la espalda cuya contracción produce la respuesta de lordosis (Kow et al., 1979).

Para establecer los circuitos o áreas que se activan en respuesta a un estímulo o conducta se ha utilizado la expresión del marcador de activación neuronal: c-Fos. c-Fos es una proteína, producto de un gen de expresión temprana: fos, expresado en neuronas poco después de su despolarización. La detección de la proteína c-Fos se puede hacer mediante técnicas inmunohistoquímicas, en las que el tejido se incuba en diversas soluciones, incluyendo una con un anticuerpo que se une específicamente a c-Fos (Takahashi & Miczek, 2015). En la rata hembra, la cópula o la estimulación vaginocervical de forma manual producen un incremento en la activación neuronal en regiones cerebrales

como el área preóptica media (mPOA), el núcleo paraventricular (PVN) y el núcleo ventromedial (VMH) del hipotálamo y en otras estructuras del sistema límbico, como la amígdala media, el núcleo accumbens y el núcleo de la base de la estría terminal (BNST), además de otras áreas cerebrales del tronco encefálico como el área tegmental ventral (VTA), el locus coeruleus (LC) y la corteza prefrontal (PFC) (Gelez et al., 2013).

En diversas áreas cerebrales; como el mPOA y la amígdala media, existe una relación directa entre la densidad de expresión de c-Fos y la cantidad de conducta sexual recibida. Por ejemplo, las hembras que recibieron intromisiones presentaron un número mayor de células que expresaron c-Fos en mPOA y amígdala media, comparadas con aquellas que sólo recibieron montas, con aquellas que sólo recibieron estimulación manual en los flancos o aquellas a las que se les seccionó el nervio pélvico (Erskine, 1993). En la corteza cingulada la inducción de c-Fos ocurre cuando la hembra copula en una arena en la que regula el ritmo de la cópula, pero no cuando la hembra recibe estimulación vaginocervical de forma manual (Pfaus & Heeb, 1997). Además, se presenta un incremento significativo de c-Fos después de 1h de cópula en este tipo de prueba en la amígdala postero-dorsal, en VMH y el BNST en comparación con la activación que ocurre en las hembras a las que no se les permitió regular el ritmo de la cópula y de aquellas que no tuvieron encuentro sexual (Erskine & Hanrahan, 1997).

Respecto al control neural de la motivación sexual se ha determinado que es la vía olfativa accesoria la que regula principalmente esta respuesta (Pfaff & Saad, 2020). Como se mencionó anteriormente, las ratas hembra en estro muestran preferencia olfativa por olores de machos sexualmente activos (Bakker, van Ophemert, et al., 1996; Kondo & Sakuma, 2005; Xiao et al., 2004). A continuación, se describirán los experimentos que demuestran la importancia de algunas áreas cerebrales en la regulación de la motivación sexual de hembras.

a) Bulbo olfatorio

Los olores no volátiles, social o sexualmente relevantes, son detectados por receptores en las neuronas del órgano vomeronasal cuyos axones proyectan al glomérulo del bulbo olfatorio accesorio (BOA) y el bulbo olfatorio principal (Scalia & Winans', 1975). De manera específica se encontró que la exposición a olores sexualmente relevantes provoca una activación neuronal tanto en la capa mitral como granular del bulbo olfatorio accesorio (Bakker, Baum, et al., 1996; Dudley et al., 1992; Hosokawa & Chiba, 2007). De manera interesante la activación del BOA fue similar entre hembras con y sin experiencia sexual (Hosokawa & Chiba, 2007).

Hembras con una sección bilateral del nervio olfatorio o a las que se les retiró el BOA en su totalidad, presentan una pérdida total de la preferencia por olores sexualmente relevantes (Romero et al., 1990). Además, existe sólo una activación neuronal cuando se presentan todos los componentes de la orina, ya que en un experimento realizado por Yamaguchi y colaboradores (2000) se demostró que la exposición de la hembra a distintas preparaciones de orina donde se separaban sus componentes según el peso molecular era ineficiente para activar c-Fos en el BOA. Esta activación se producía únicamente cuando todas las fracciones del liofilizado de orina eran presentadas en su conjunto (Yamaguchi et al., 2000).

Las células mitrales del BOA envían proyecciones a los núcleos amigdalinos, como la amígdala medial antero dorsal (MeAD) y la amígdala medial postero dorsal (MePD); las neuronas de la MeAD proyectan al núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH) y al área preóptica lateral, mientras que las neuronas de la MePD, a través del núcleo de la base de la estría terminal (BNST) mandan axones de proyección al mPOA (Swanson, 2000; Von-Campenhausen & Mori, 2000; Wood, 1997). Es importante señalar que en todas estas áreas se expresa el ER α , por lo tanto, cada uno de estos sitios es crucial para el control de la respuesta hormonal ante estímulos sexualmente relevantes (Choi et al., 2005). Utilizando métodos inmunohistoquímicos para visualizar la proteína c-

Fos se ha demostrado, en hembras y machos, que estímulos sexuales activan varias estructuras que forman parte del sistema olfatorio accesorio (Bakker, Baum, et al., 1996; Baum & Ewritt, 1992; Bennett et al., 2002; Bressler & Baum, 1996; Coolen et al., 1996; Domínguez-Salazar et al., 2002; Dudley et al., 1992; Erskine & Hanrahan, 1997; Hosokawa & Chiba, 2007; Kelliher et al., 1999; Paredes et al., 1998; Pfaus et al., 1993; Portillo & Paredes, 2004) y el núcleo accumbens (Bakker, Baum, et al., 1996; Hosokawa & Chiba, 2007; Kelliher et al., 1999; Pfaus et al., 1993), una estructura que se ha implicado en la retribución sexual femenina (Becker et al., 2001).

a) Amígdala

Como ya se mencionó, el segundo sitio de sinapsis en el sistema olfativo accesorio está ubicado en la amígdala medial. Dentro de esta estructura pueden reconocerse al menos dos partes importantes, la MeAD y MePD (la mayor concentración de receptores a esteroides se encuentra en esta zona) (Olucha-Bordonau et al., 2015). Respecto al papel de la amígdala en el control de la respuesta sexual de la rata hembra, se ha observado que la lesión de la amígdala medial provoca una disminución en el QL tras la cópula continua (Rajendren & Moss, 1993), sin modificar la conducta de *spacing* (Guarraci et al., 2004). En cuanto a la motivación sexual, varios experimentos han demostrado que la exposición de hembras a estímulos sexualmente relevantes produce activación de esta área cerebral (Bakker, van Ophemert, et al., 1996), esta activación ocurre en hembras con experiencia sexual previa (Hosokawa & Chiba, 2007). Además, Bennet y colaboradores (2002) encontraron que las neuronas amigdalinas que se activaban contenían receptores a estrógenos tipo alfa ($ER\alpha$) y no a progesterona o a estrógenos tipo beta ($Er\beta$), lo cual sugiere un papel importante del $ER\alpha$ en la regulación de la motivación sexual mediada por la amígdala (Bennett et al., 2002). Asimismo, la lesión electrolítica de la amígdala medial en el ratón hembra elimina la preferencia por el olor de orina de un macho intacto versus uno castrado (DiBenedictis et al., 2012) y la destrucción del núcleo amigdalino posteromedial de la rata hembra suprime la

preferencia por olores de un macho experto comparado con la preferencia por olores de un macho castrado. Esta disminución se mantiene incluso incrementando las dosis de estrógenos (Kondo, 2005). Estos resultados, tomados en su conjunto, permiten concluir que varios núcleos amigdalinos juegan un papel crucial en el control neural de la motivación sexual.

b) Núcleo de la base de la estría terminal

Varios estudios han evaluado el papel del núcleo de la base de la estría terminal (BNST) sobre la motivación sexual femenina (Pfaff & Saad, 2020). En una investigación realizada en el hámster se encontró que la lesión de esta área no disminuye las respuestas de acercamiento frente al macho, resultados similares se obtuvieron al utilizar ratas hembra que no expresaban el ER α en BNST, donde no se modificó ninguna de las conductas sociosexuales de estos animales (Snoeren et al., 2015). Sin embargo, en esta estructura cerebral todos los estudios han encontrado una activación, medida por c-Fos, en hembras después de exponerse a olores sexualmente relevantes (Bakker, Baum, et al., 1996; Bennett et al., 2002; Dudley et al., 1992; Hosokawa & Chiba, 2007). Además, en esta área cerebral existe una mayor expresión de c-Fos en hembras que regulan el ritmo de la cópula en comparación con aquellas que sólo recibieron montas e intromisiones en condiciones que no regulan la cópula (Erskine & Hanrahan, 1997), por lo tanto, podríamos concluir que BNST juega un papel importante en la regulación de algunas conductas como el *spacing* y la detección de olores sexuales.

c) Área preóptica media del hipotálamo

Inhibir la actividad del área preóptica media del hipotálamo (mPOA) provoca un incremento en el QL de hembras ovariectomizadas y suplementadas con hormonas (Hoshina et al., 1994; Takeo et al., 1993), pero reduce las conductas proceptivas e incrementa las conductas de rechazo al macho (Blaustein & Erskine, 2002). Sin embargo, y al igual que para el núcleo de la base de la estría terminal, varios estudios han mostrado la activación del mPOA (medida por la expresión de c-Fos) en el cerebro de ratas hembra después de haberse

expuesto a estímulos de machos sexualmente expertos (Bakker, Baum, et al., 1996; Hosokawa & Chiba, 2007). La lesión de esta área elimina la preferencia por investigar olores provenientes de macho tanto en ratas (Xiao et al., 2005) como en hámster hembra (Martinez & Petrulis, 2013), dicha preferencia también se ve eliminada en hembras knockdown al receptor ER α en el mPOA (Spiteri et al., 2012). Por lo tanto, podemos concluir que el mPOA está involucrada en la regulación de conductas como la lordosis, la proceptividad, la agresividad y la motivación sexual. Es importante señalar que neuronas del mPOA que contienen el receptor ER α parecen esenciales para regular aspectos relacionados con la motivación sexual evaluada a través de la preferencia de olores sexuales.

d) Núcleo ventromedial del hipotálamo

El núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH) está involucrado en la ejecución de la lordosis y en la expresión de las conductas proceptivas (Pfaff et al., 1995). Se ha demostrado también que la lesión de este sitio en ratas ovariectomizadas provoca menos acercamientos al macho, a pesar de haber recibido estradiol y progesterona de manera exógena, lo cual indica que VMH está involucrado de manera directa en la elección de pareja (Paredes & Alonso, 1997). Además, el núcleo ventromedial del hipotálamo es parte esencial de la vía olfatoria accesoria. Así, en el VMH ocurre un aumento en el número de células inmunorreactivas a c-Fos cuando las hembras copulan (Coolen et al., 1996) o bien cuando sólo se exponen a estímulos olfativos de machos sexualmente expertos (Dudley et al., 1992; Hosokawa & Chiba, 2007). Sin embargo, esta activación sólo ocurrió en hembras que antes habían experimentado conducta sexual. Este último resultado indica que la activación de esta estructura cerebral depende de la experiencia sexual previa de las hembras.

e) Núcleo accumbens

El núcleo accumbens no es parte de la vía olfatoria accesoria, pero juega un papel fundamental en la motivación sexual femenina (Sakuma, 2008). Así, por

ejemplo, se ha demostrado que la inyección a ratas hembra de metabolitos de la testosterona [3α androstanodiol]; en específico en la región “*shell*” del núcleo accumbens, incrementa la motivación sexual femenina (Sánchez Montoya et al., 2010), indicando que esta área cerebral participa en la regulación neuroendocrina de la motivación sexual femenina. Además, la exposición a un macho sexualmente activo (o el ejercicio de la conducta sexual) incrementa los niveles de dopamina en el núcleo accumbens de hembras sexualmente receptivas. Sin embargo, este incremento en dopamina no ocurrió cuando los animales sólo se expusieron a olores sexualmente relevantes (Pfaus et al., 1995). Otros datos señalan que la lesión selectiva del núcleo accumbens en hembras tratadas con hormonas esteroides disminuye el número de aproximaciones de la hembra al macho y reduce las conductas proceptivas, a la vez de incrementar las conductas de rechazo (Rivas & Mir, 1990). Por último, en relación con la activación de esta zona cerebral, medida por c-Fos, en hembras expuestas a estímulos sexualmente relevantes, se ha encontrado una activación diferencial entre las regiones “*core*” y “*shell*” del núcleo accumbens. Así, Bakker et al. en 1996, demostraron que frente a la exposición de olores sexualmente relevantes (de machos sexualmente activos) existe una expresión de la proteína c-Fos en el “*core*” del núcleo accumbens de hembras, mientras que no existe una activación cerebral del “*shell*” (Bakker, Baum, et al., 1996). Todos estos datos suman información relevante sobre la regulación que tiene el núcleo accumbens en el control de la motivación sexual femenina.

1.10 Efecto de la hiperglucemia severa y la hiperglucemia moderada sobre la respuesta sexual femenina

1.10.1 Modelos de hiperglucemia: administración de STZ

Para estudiar los cambios metabólicos que caracterizan a la DM se han utilizado diversos modelos animales entre ellos se encuentran los modelos genéticos (las ratas Zucker, el ratón KK, las ratas cohen), hiperglucemia generada por la destrucción química de las células pancreáticas (mediante alloxan o estreptozotocina) o la remoción quirúrgica del páncreas, dietas

altas en grasa o azúcar (Arulmozhi et al., 2004). Por su relativa facilidad y bajo costo, la administración de estreptozotocina (2-deoxy-2([metil(nitroso) amino] carbonil-amino)- β -D-glucopiranos) (STZ) es uno de los modelos más utilizados en el estudio de la DM.

La STZ es un metabolito obtenido del hongo *Streptomyces achomogenes* (Bell & Hye, 1983). Por su estructura química se le considera como un análogo citotóxico de la glucosa, dicha estructura le permite interactuar (con baja afinidad) con el transportador de glucosa 2 (GLUT2) expresado en la membrana de las células β pancreáticas, hepatocitos, células del túbulo renal entre otras. Aunque también provoca un daño en otras células, la principal actividad citotóxica se presenta en las células β pancreáticas debido a que éstas son más activas en la recaptura de glucosa. Una vez dentro de la célula, la STZ provoca la muerte celular debido a la fragmentación del DNA, provocada por la metilación de su estructura, y la generación de óxido nítrico y de radicales libres como el peróxido de hidrógeno (Goyal et al., 2016; Ogbonnaya et al., 2013). La dosis y la vía de administración resultan determinantes para el tipo de diabetes que se desea modelar. Por ejemplo, la administración de STZ en la rata adulta provoca una deficiencia casi total de insulina, generando hiperglucemia severa, dislipidemia y pérdida de peso que simulan algunos de los cambios metabólicos que se observan en la DM1 (Becker, 2009; Kovacs et al., 2003).

Se han intentado modelar algunas de las complicaciones a largo plazo de la DM2 con la administración de STZ en roedores en etapa neonatal. En este modelo, los roedores presentan hiperglucemia, intolerancia a la glucosa, polifagia, polidipsia, poliuria e hipoinsulinemia, que se mantienen de forma asintomática hasta la adultez. La administración de STZ durante el periodo neonatal provoca una destrucción parcial (20% sobreviven) de las células beta pancreáticas que es insuficiente para mantener la normoglucemia. Esta pérdida es compensada por las células que aún no se han diferenciado. Después de un tiempo (6-8 semanas) existe una baja en

la función de las células β y se presenta una disminución marcada en la capacidad del páncreas para liberar insulina en respuesta a la glucosa (Giddings et al., 1985; Serradas & Dolz, 2007). Existen diversas variantes en este modelo dadas por el día de la administración del fármaco (al día 0, 2 ó 5 postnatal) o por la vía de administración (subcutánea, intraperitoneal o intravenosa) (Serradas & Dolz, 2007). Se sabe que la capacidad de regeneración de las células β pancreáticas en las ratas Wistar disminuye rápidamente durante la primera semana de vida postnatal y que esta regeneración no sucede en el páncreas de la rata adulta. Sin embargo, pocos son los reportes en los que se exponen las ventajas del día de administración (Bequer et al., 2016). A pesar de que en la población general la prevalencia de pacientes con DM2 es mayor, la mayoría de los trabajos experimentales que estudian la DM utilizan el modelo que reproduce las condiciones clínicas de una DM1 pobremente controlada, debido a que realizar experimentos con animales en la etapa neonatal requiere de más esfuerzo de cuidado y de mayor tiempo de experimentación.

En este proyecto se utilizaron estos dos modelos, para observar y comparar los efectos que pudieran tener la hiperglucemia/hipoinsulinemia severa y moderada sobre la motivación sexual de ratas hembra, debido a que en la clínica los efectos de la hiperglucemia en el organismo parecen variar dependiendo del tipo de diabetes.

1.10.2 Hiperglucemia severa y conducta sexual

Cómo se mencionó, la administración de STZ en la rata adulta provoca una hiperglucemia severa (niveles de glucosa aleatoria > 300 mg/dl). En las ratas hembra la inyección de esta pancreotoxina tiene efectos mayúsculos sobre la regularidad del ciclo estral: la mayoría de los animales tratados con STZ presentan un bajo número de proestros naturales, acompañado de un incremento en el número de diestros a lo largo de 25 días (Rebolledo-Solleiro & Fernández-Guasti, 2018), debido a una desregulación en la secreción de LH (Bestetti et al., 1985). Con esas bases, la investigación

acerca de la conducta sexual de la rata hembra en un modelo de hiperglucemia severa ha utilizado ratas ovariectomizadas (OVX) suplementadas con hormonas, estradiol y progesterona para poder inducir la expresión de conducta sexual. Los resultados de esas investigaciones señalan que estos animales presentan una clara disminución tanto en el QL como en la IL (Ahdieh et al., 1983; Gentry & Blaustein, 1977; Hashimoto et al., 2010; Hernández-Munive et al., 2018; Karkanias et al., 1997; Kovacs et al., 2003; Saito et al., 1999; Siegel & Wade, 1979). Esta reducción se revierte con la administración de insulina, ya sea de manera periférica (Hashimoto et al., 2010; Hernández-Munive et al., 2018; Karkanias et al., 1997) o central (Kovacs et al., 2003).

Para determinar el efecto que tiene la hiperglucemia severa sobre la motivación sexual de las hembras se han tratado de evaluar algunos parámetros que se consideran un índice de motivación sexual como la proceptividad, las latencias de retorno al macho después de recibir estimulación en el modelo donde la hembra regula el ritmo de la cópula (*paced mating*) (Heijkoop et al., 2018), el tiempo de permanencia en el compartimento donde se encuentra un macho sexualmente experto (también evaluado en la prueba de *paced mating*), o indirectamente, al evaluar los comportamientos agresivos presentados durante el encuentro sexual (Ventura-Aquino & Paredes, 2016), recordando que un mayor número de conductas de rechazo se interpreta como una menor motivación de la hembra para continuar la cópula.

Con respecto a la proceptividad, algunos autores han reportado que en el modelo de hiperglucemia severa existe una disminución en el porcentaje de animales que exhiben estas conductas (Saito et al., 1999) así como en el número de eventos (Karkanias et al., 1997), mientras que otros no observaron dichos cambios (Ahdieh et al., 1983; Hernández-Munive et al., 2018); sin embargo, después de la administración de insulina se observa un

aumento en el número de eventos proceptivos presentados por las hembras hiperglucémicas (Hernández-Munive et al., 2018; Karkanias et al., 1997).

Adicionalmente, debido a la baja receptividad (evaluada a través del QL e IL) presentada por las hembras con hiperglucemia severa y, por lo tanto, a la baja estimulación vaginocervical que recibieron por parte del macho en el modelo de *paced mating*, fue imposible calcular las latencias de retorno después de una intromisión o eyaculación. Además, el tiempo de permanencia en el compartimento donde se encontraba el macho no mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control, sin quedar claro si esto era debido a que las hembras buscaban el componente social (más que el sexual) ofrecido por el macho (Hernández-Munive et al., 2018).

Por último, las conductas agresivas aumentaron cuando la hembra hiperglucémica no tuvo la posibilidad de controlar el ritmo de la cópula (comportamientos que disminuyen con la administración de insulina); y, aun cuando se le ofreció a la hembra la posibilidad de alejarse del macho al ser expuesta a la prueba de *paced mating*, donde ella regula el ritmo de la cópula, todavía existió una tendencia al aumento de las conductas agresivas (Hernández-Munive et al., 2018). En su conjunto (tabla 1), esta información no nos da un panorama claro sobre lo que podría estar pasando con la motivación sexual de la hembra con hiperglucemia severa.

1.10.3 Hiperglucemia moderada y conducta sexual

La información referente a lo que ocurre con la conducta sexual de la rata hembra en el modelo de hiperglucemia moderada (niveles de glucosa después de un reto de sacarosa > a 250 mg/dl) es escasa.

En este modelo se pueden utilizar hembras naturalmente ciclantes, debido a que no existen cambios en el número de proestros naturales a lo largo de 14 días (Hernández-Munive et al., 2019; Inhasz et al., 2013), como ocurre

en el modelo de hiperglucemia severa (Rebolledo-Solleiro & Fernández-Guasti, 2018) .

Las hembras con hiperglucemia moderada no presentan cambios en el cociente o la intensidad de la lordosis (Hernández-Munive et al., 2019; Inhasz et al., 2013). Sin embargo, muestran una disminución en las conductas proceptivas cuando no se les permite regular el ritmo de la interacción sexual -cópula no regulada- (Hernández-Munive et al., 2019). En la evaluación conductual en la prueba de cópula regulada, estas hembras no realizaron el “*paced*” (abandonar el compartimento del macho después de recibir estimulación vaginocervical) a pesar de recibir la misma estimulación vaginocervical (el mismo número de intromisiones) que el grupo control, planteándose la hipótesis de que quizás las hembras no distinguen entre los estímulos recibidos, lo que imposibilitó evaluar la motivación sexual a través de dicha prueba (Hernández-Munive et al., 2019).

A manera de resumen, en la tabla 1 se presenta una comparación de los efectos de la hiperglucemia severa o moderada sobre algunos parámetros de la conducta sexual de la rata hembra.

	Hiperglucemia severa	Hiperglucemia moderada
Lordosis	Disminución	Sin cambios
Proceptividad	Controversial	Disminución
Latencias de retorno <i>paced mating</i>	Conducta no realizada	Conducta no realizada
Tiempo de permanencia con el macho <i>paced mating</i>	Sin cambios	Sin cambios
Agresividad	Aumento	Sin cambios

Tabla 1. Comparación de los efectos de la hiperglucemia sobre la conducta sexual femenina. Las comparaciones fueron realizadas contra su respectivo grupo control tratado con buffer (Hernández-Munive, 2017).

A pesar de todas las aproximaciones realizadas, el efecto que tiene la hiperglucemia severa (modelo de DM1) o moderada, pero de manera crónica (modelo de DM2) sobre la motivación sexual no ha quedado determinada. Por lo tanto, en el presente trabajo se utilizaron dos modelos para evaluar la motivación sexual a través de los comportamientos de acercamiento hacia una pareja: la prueba de motivación sexual incentiva (MSI) y la prueba de preferencia de pareja (PP). Las hembras con mayor motivación sexual pasan más tiempo con un compañero sexual [macho sexualmente experto (SE)] que con un compañero social [es decir, un macho castrado (CA)]. Además, se analizó la motivación sexual usando una prueba que únicamente utiliza estímulos olfatorios como la prueba de tiempo de olfacción de estímulos sexuales.

1.11 Administración de STZ y expresión de c-Fos

c-Fos es una proteína producto del gen temprano, fos, generada poco después de la despolarización neuronal y se considera que es un buen marcador de actividad neuronal que puede utilizarse para identificar las áreas cerebrales involucradas en ciertas conductas, por lo anterior, c-Fos fue utilizado en este diseño experimental para determinar si existen cambios en la actividad neuronal generados por la hiperglucemia/ hipoinsulinemia en diversas áreas cerebrales implicadas en el desarrollo de la motivación sexual (Gelez et al., 2013).

A nuestro conocimiento no existen reportes sobre la activación neuronal que se presenta después de la conducta sexual de ratas hiperglucémicas. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que la administración de STZ en la etapa adulta provoca alteraciones en la actividad neuronal. Por ejemplo, el grupo de Morgado, partiendo de la premisa de que las ratas hiperglucémicas presentan neuropatía, evaluó la actividad de las neuronas espinales después de la administración de STZ a lo largo de 6 semanas. Una semana después de la administración de STZ se genera, además de la hiperglucemia y los cambios conductuales de la neuropatía diabética, un

aumento moderado en la expresión de c-Fos en el asta dorsal de la médula espinal, incremento que se observa hasta la cuarta semana de tratamiento. Este grupo señala que estos cambios funcionales pudieran estar relacionados con las anomalías sensoriales presentadas por las ratas hiperglucémicas (Morgado & Tavares, 2007).

Otro grupo de investigación señala que después de dos días de la administración de STZ existe una disminución en la expresión de c-Fos en el hipocampo. Este hallazgo posiblemente está relacionado con las evidencias que indican que la hiperglucemia provoca alteraciones en el aprendizaje y la formación de memoria (Jang et al., 2003). De manera interesante, la hiperglucemia genera distintos efectos en la expresión basal de c-Fos en el cerebro: en el hipotálamo anterior se presenta una disminución en las células positivas a c-Fos después de la administración de STZ, mientras que, en el núcleo paraventricular, el núcleo supraóptico y el mPOA se expresa un mayor número de células positivas a c-Fos al compararse con el grupo que sólo recibió el vehículo. Dicho incremento es aún mayor cuando las ratas hiperglucémicas son sometidas a deshidratación por 24 h (Zheng et al., 2002). Estas evidencias permiten suponer que posiblemente las ratas con hiperglucemia también presenten una expresión distinta de c-Fos después de presentarles un estímulo sexual o uno social.

II. Justificación

La investigación del impacto que tiene la DM sobre la vida sexual de las pacientes o sobre la conducta sexual, en el caso de los roedores tratados con STZ, se ha enfocado en los aspectos consumatorios del encuentro sexual, dejando de lado la motivación sexual. En los pocos estudios en los que se intentó evaluar este componente, no se llegó a una conclusión definitiva, ya sea porque se encontraron datos contradictorios, o porque algunos parámetros no pudieron cuantificarse. Por lo tanto, decidimos evaluar tanto la expresión de las conductas que reflejan motivación sexual en los modelos adecuados, así como la posible activación neuronal diferencial (entre animales hiperglucémicos y control) en distintas áreas cerebrales que regulan la motivación sexual a través de la expresión de la proteína c-Fos.

III. Objetivos

Objetivo general

Evaluar la motivación sexual de hembras hiperglucémicas (hiperglucemia severa e hiperglucemia crónica-moderada) en distintos modelos y determinar la posible activación diferencial de distintas áreas cerebrales ante un estímulo sexual o social.

Objetivos específicos

- a) Evaluar la preferencia de pareja (PP), la motivación sexual incentiva (MSI) y la preferencia por olores sexuales de ratas hembra con hiperglucemia moderada o severa.
- b) Evaluar la capacidad olfativa de hembras con hiperglucemia moderada o severa frente a estímulos de alimentos palatables.
- c) Determinar si los cambios en la MSI, en la PP y en la prueba de olfacción producidos por la hiperglucemia severa en hembras se revierten por la administración exógena de insulina.
- d) Determinar la actividad neuronal, medida por c-Fos, en la vía olfatoria accesoria (los bulbos olfatorios accesorios, el BNST, el mPOA y el VMH) y en el núcleo accumbens de hembras control y tratadas con STZ en la etapa adulta, después de presentarles un estímulo que despierte su motivación sexual.

IV. Hipótesis

- a) Las ratas con hiperglucemia severa mostrarán una disminución en la motivación sexual al compararse con el grupo control, en todos los modelos conductuales utilizados (PP, MSI, olores sexuales).
- b) La administración periférica de insulina crónica revertirá los efectos de la hiperglucemia severa sobre la motivación sexual.
- c) Las ratas hembra tratadas con STZ en la etapa neonatal y con hiperglucemia moderada mostrarán una disminución en la motivación sexual al compararlas con el grupo control.
- d) Las ratas hembra con hiperglucemia severa mostrarán una disminución en la activación neuronal (evaluada mediante la expresión de c-Fos) en áreas cerebrales que participan en la regulación de la motivación sexual (vía olfatoria accesoria y el núcleo accumbens) cuando se les presente un macho sexualmente experto.

V. Materiales y métodos.

4.1 Sujetos experimentales

Para el modelo de hiperglucemia severa -inducida en la etapa adulta- se utilizaron ratas hembra de la cepa Wistar adultas de 250-300 g, mientras que para el modelo de hiperglucemia moderada -inducida en la etapa neonatal- se utilizaron ratas hembra neonatas (3-4 días) de la cepa Wistar.

Como estímulos se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar adultas de 300-450 g divididas en dos subgrupos: a) machos sexualmente expertos [SE] (animales con experiencia sexual previa que eyacularon en menos de 15 minutos en 5 sesiones de cópula) y b) machos castrados [CA] (animales a los que se les extirparon los testículos y el epidídimo 15 días antes de la prueba y que no tuvieron experiencia sexual).

Todos los animales fueron alojados en condiciones controladas con ciclo de luz-oscuridad invertida de 12 horas de luz / 12 horas de oscuridad (inicio fase de luz 22:00h), a una temperatura de 22-24° C, con alimento y agua *ad libitum*. Las pruebas conductuales se efectuaron dentro de las primeras 5 horas de la fase oscura. El manejo de los animales se realizó de acuerdo con lo descrito en la NOM-062-ZOO-1999 y por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los animales de laboratorio (CICUAL) del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (protocolo aprobado :0026-13).

4.2 Diseño experimental

4.2.1 Modelos de hiperglucemia

Administración de STZ a ratas en la etapa adulta (hiperglucemia severa)

Como fue señalado previamente, después de la administración de STZ en la etapa adulta, las hembras presentan una disminución en el número de proestros a lo largo del ciclo estral (Bestetti et al., 1985; Rebolledo-Solleiro & Fernández-Guasti, 2018). Por lo tanto, en este diseño experimental se utilizaron ratas ovariectomizadas, a las que se les indujo la respuesta sexual

con la administración de hormonas exógenas: 10 microgramos de benzoato de estradiol (sc), 24 h antes de la prueba, seguidos por la administración de 4 mg de progesterona (sc) 4 horas antes de la prueba conductual.

Siete días después de la ovariectomía (OVX), a un grupo de hembras se les administró STZ (100 mg/kg) por vía intraperitoneal (i.p.) diluida en buffer de citratos 0.1 M, pH= 4.7. Esta dosis fue administrada en 2 días consecutivos, dividida en 50 mg/kg/día y al grupo control se le administró únicamente 1ml/kg de buffer de citratos al 0.1 M, como fue descrito con anterioridad (Hernández-Munive et al., 2018) (Figura 2).

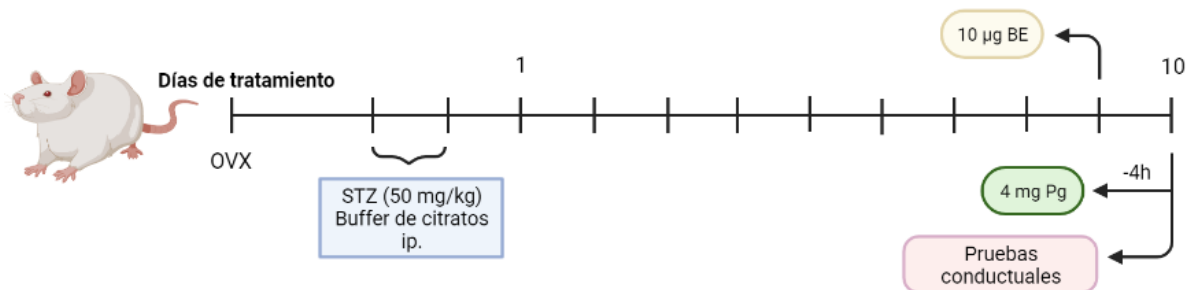


Figura 3. Diseño experimental. Administración de STZ en etapa adulta. (BE= benzoato de estradiol, i.p. intraperitoneal, OVX= ovariectomía, Pg= progesterona, STZ: estreptozotocina).

Las pruebas conductuales se realizaron 10 días después de la administración del fármaco. Después de cada prueba los niveles de glucosa plasmática se evaluaron con un glucómetro (Accu-Check performa) tomando una gota de sangre mediante punción de la punta de la cola del animal. Aquellos animales con niveles de glucosa plasmática mayores a 300 mg/dl se consideraron hiperglucémicos.

- Administración de insulina periférica

Basados en diversas curvas dosis respuesta realizadas previamente en el laboratorio, en este diseño experimental se utilizó la insulina glargina (Cronix, PiSA Laboratories, México) administrada por vía subcutánea. Veinticuatro horas después de la última administración de STZ, se

administró insulina glargina en un esquema de cada 12 h de la siguiente forma: 2U a las 9:00 am y 4U a las 9:00 pm durante 7 días consecutivos. Para evitar que los animales presentaran hipoglucemia (valores de glucosa en sangre por debajo del rango normal), los días 8 y 9 se administraron 2U a las 9:00 am y 2U a las 9:00 pm. Finalmente, en el décimo día se administraron 2U de insulina a las 9 am y 4-5 h después se realizaron las pruebas conductuales (figura 4). Sólo las hembras que presentaron valores de glucemia normales (70-100 mg/dl) se incluyeron en el análisis conductual.

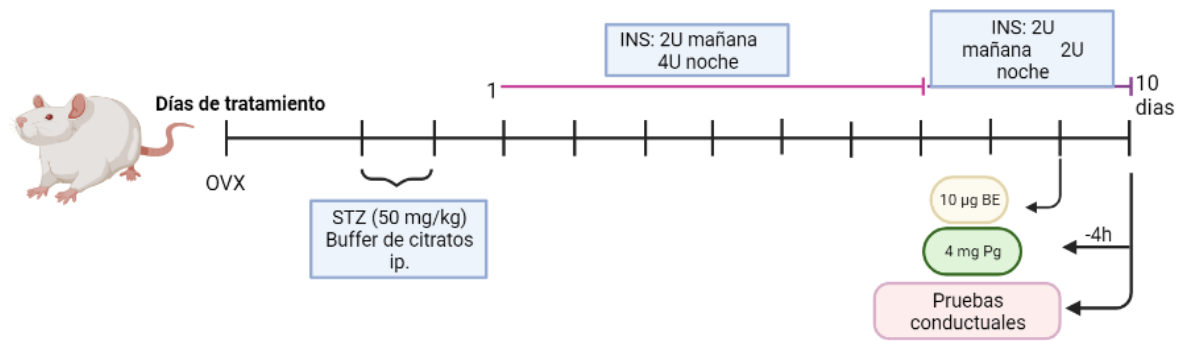


Figura 4. Diseño experimental. Administración de STZ en etapa adulta con restitución de insulina periférica.

(BE= benzoato de estradiol, i.p. intraperitoneal, OVX= ovariectomía, Pg= progesterona).

Administración de STZ a ratas en etapa neonatal (hiperglucemia moderada)

Ratas hembra de la cepa Wistar neonatas (3-4 días) se distribuyeron de forma aleatoria para formar 2 grupos a los que se les administró por vía intraperitoneal una dosis única de STZ (70 mg/kg) disuelta en buffer de citratos o buffer de citratos 0.1M, pH=4.5 (grupo control) (i.p.), como ha sido descrito previamente (Oidor-Chan et al., 2016) (figura 5).

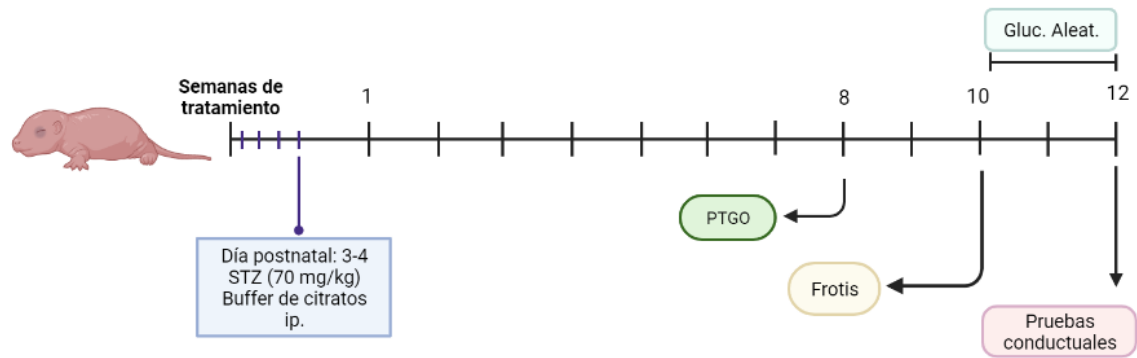


Figura 5. Diseño experimental. Administración de STZ en la etapa neonatal.

(PTGO: prueba de tolerancia a la glucosa oral, STZ: estreptozotocina, i.p.: intraperitoneal).

- Prueba de tolerancia a la glucosa oral

Esta prueba se realizó después de 8 semanas de la administración neonatal de buffer o STZ. Antes de llevar a cabo este procedimiento, los animales fueron habituados durante 4 días a la manipulación necesaria para introducir la cánula intragástrica. En el quinto día, se midió en ayuno la glucosa basal (tomando una gota de sangre de la punta de la cola del animal mediante punción) con un glucómetro (Accu-Check performa). Las ratas fueron pesadas y administradas con 2 g/kg de sacarosa disuelta en agua por vía oral. Se midieron los niveles plasmáticos de glucosa a los 30, 60, 90, 120 y 180 minutos después de la administración de la solución de sacarosa. Se consideraron hiperglucémicos a los animales que presentaron niveles plasmáticos de glucosa mayores a 250 mg/dl tras 30 ó 60 minutos de la administración de sacarosa.

- Ciclo estral

Debido a que las hembras tratadas con STZ en la etapa neonatal no presentan cambios en el ciclo estral (Hernández-Munive et al., 2019) se utilizaron hembras intactas en este estudio. En la semana 10 de vida y a lo largo de 14 días, se le dio seguimiento al ciclo estral mediante la toma de frotis vaginal que consiste en la inserción gentil de la punta de un gotero con

solución salina (NaCl 0.9%) en la vagina de la rata; la secreción vaginal se recolectó en un portaobjetos y se observó la citología en el microscopio de luz con el objetivo 10X para determinar la fase del ciclo estral (ver Introducción).

- Glucosa aleatoria

Debido a que en este modelo los animales presentan valores de glucosa aleatoria >259 mg/dl (en condiciones de no ayuno), de la semana 10-12 de vida se evaluaron los niveles de glucosa plasmática con un glucómetro (Accu-Check performa) tomando una gota de sangre mediante punción de la punta de la cola del animal. Esta medición se realizó de manera aleatoria, es decir, en cualquier momento del día sin haber retirado el alimento.

En este modelo de hiperglucemia las pruebas conductuales se realizaron cuando la hembra se encontraba en la fase de proestro.

4.2.2 Pruebas conductuales

En este diseño experimental se realizaron 4 pruebas conductuales: dos basadas en la elección de pareja (prueba de preferencia de pareja (PP) y la prueba de motivación sexual incentiva (MSI)) y dos basadas en la capacidad olfativa (prueba relativa a olores sexuales y prueba relativa a olores de alimentos palatables). A continuación, se describen cada una de ellas.

- Preferencia de pareja (PP)

La rata hembra se colocó en una caja con tres compartimentos (60 x 30 x 40 cm cada uno) con una abertura (13 x12 cm) en ambas particiones cerca de la parte frontal (figura 6). En los compartimentos del lado derecho e izquierdo fueron colocados los animales estímulo: macho SE y macho CA. Los machos incentivos estuvieron sujetos mediante un arnés para impedir su salida del compartimento y limitar el movimiento. Es importante señalar que en cada compartimento hay aserrín impregnado con el olor del animal estímulo. El tercer compartimento se consideró neutro ya que no se colocó estímulo y el aserrín se mantuvo sin olor. Un día antes de la prueba, se

permitió que la hembra deambulara libremente entre los compartimentos durante 10 minutos sin los animales estímulo presentes.

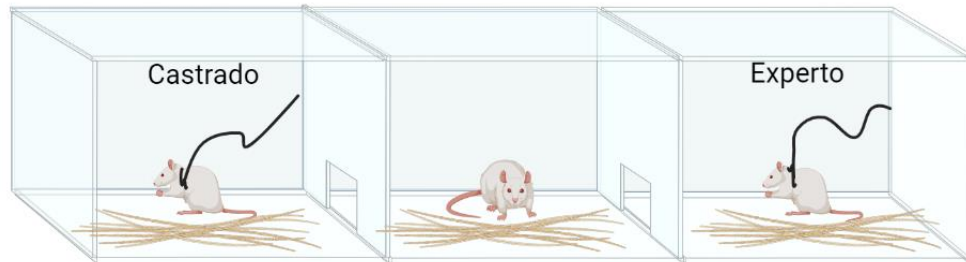


Figura 6. Arena tricompartmental donde se realiza la PP.

La prueba tuvo una duración de 15 minutos y se registró el tiempo de permanencia del sujeto experimental en cada uno de los compartimentos, así como la conducta sexual presentada por la hembra: cociente de lordosis ($[\#lordosis / \#montas] * 100$) y el número de conductas proceptivas y agresivas realizadas con cada uno de los animales estímulo.

- Motivación sexual incentiva

Para esta prueba experimental se utilizó una arena rectangular de 50 x 100 cm (Ágmo, 2003) con dos compartimentos laterales (30 x 20 cm) colocados en lados opuestos, los cuales están conectados a la arena a través de una pared de acrílico con orificios permitiendo que el sujeto pueda oler, escuchar y ver a los sujetos incentivos (un macho SE o un macho CA), sin que pueda acceder a ellos. Frente a cada compartimento se delimitó una zona incentiva de 15 x 25cm (figura 7). Las hembras se habituaron a la arena durante tres días consecutivos en sesiones de 10 minutos (sin los animales estímulo presentes), girando la arena cada día para evitar que se estableciera preferencia de lugar.

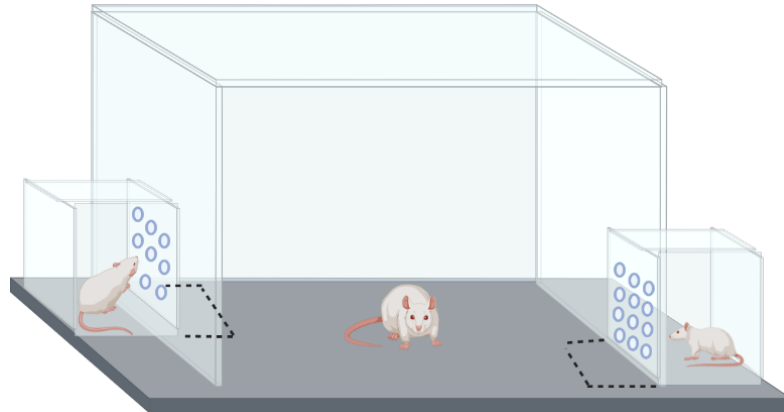


Figura 7. Arena utilizada para la prueba de MSI.

El día de la prueba, los animales estímulo se colocaron en los compartimentos y al sujeto experimental en el centro de la arena, permitiéndole explorar durante 10 minutos. Se cuantificó el tiempo acumulativo que pasó en cada una de las zonas incentivadas o en la zona neutra.

-Prueba de preferencia por olores sexuales

En el centro de una caja rectangular (50 x 100 cm) se colocaron tres tazones que contenían aserrín tomado de cajas que alojaron solamente a machos SE o a machos CA o aserrín totalmente limpio (figura 8). Antes de realizar la prueba, los animales fueron habituados a la arena durante 3 días, permitiéndoles explorar libremente por 10 minutos los tazones vacíos. El día de la prueba se colocó el aserrín en cada uno de los cuencos y se determinó el tiempo que las hembras investigaron cada uno de los cuencos.



Figura 8. Arena utilizada para la prueba de olores sexuales.

Prueba de olfato relativa a alimentos palatables

Dos días antes de realizar esta prueba, las hembras se alojaron en cajas individuales y una vez al día se introdujo un pequeño trozo de chocolate (2 g) para que los animales reconocieran este nuevo olor/sabor y evitar la neofobia. La prueba de olfato se realizó en un redondel donde se escondió un pequeño trozo de chocolate de forma aleatoria (figura 9). La hembra se colocó en la arena y se evaluó la proporción de animales que encontraron el chocolate en 10 min y la latencia para encontrar el chocolate (latencia máxima de 10 minutos).

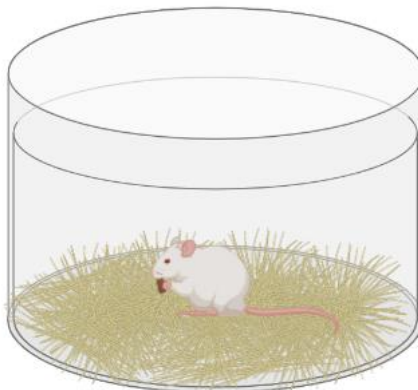


Figura 9. Arena utilizada para la prueba de olores/alimentos palatables.

Todas las pruebas fueron videograbadas para poder ser analizadas con detalle posteriormente utilizando el programa *Observer (Noldus)*.

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

Para determinar la actividad cerebral de las hembras frente a un estímulo relevante, se colocaron en una arena circular de acrílico dividida por una malla metálica para que la hembra pudiera olfatear, escuchar y ver al estímulo sin tener contacto físico con él durante 30 minutos. Este tiempo se seleccionó ya que experimentos previos de nuestro laboratorio (Hernández-González, 2021) muestran que 20 minutos de exposición frente a un estímulo fue capaz de activar varias áreas cerebrales, medidas por c-Fos, en machos con diferente preferencia sexual. Sólo se incluyeron hembras con hiperglucemia severa (administradas con STZ en la etapa adulta), ya que bajo esta condición se observaron los efectos conductuales más prominentes. Se formaron 6 grupos experimentales:

- a) hembras (control o con hiperglucemia), sin un animal estímulo frente a ellas. Este grupo sirvió para controlar la activación de c-Fos por factores ajenos a la exposición a un animal estímulo (arena, ruido, manipulación, etc.)
- b) hembras (control o con hiperglucemia) frente a un macho castrado.
- c) hembras (control o con hiperglucemia) frente a un macho sexualmente experto.

Se incluyeron 5 animales en cada grupo. Al finalizar el tiempo establecido, el macho fue retirado y la hembra se mantuvo en el redondel sin manipulación durante 90 minutos, tiempo en el que la expresión de c-Fos es máxima (Koprdoва et al., 2018). Las hembras fueron sacrificadas con una sobredosis de pentobarbital y perfundidas de forma intracardiaca con una solución de buffer de fosfatos (PBS, 0.1M, pH=7.4) seguida de una solución de paraformaldehído al 4% (PFA, pH= 7.4) para la fijación del

tejido. Se obtuvieron los cerebros y el tejido fue cortado de manera coronal. Utilizando un crióstato se obtuvieron secciones de 40 μm , y con ayuda de el atlas Paxinos (Paxinos & Watson, 1997) se separó el tejido donde se encontraban las áreas cerebrales de interés:

- a) Bulbo olfatorio accesorio (BOA)
- b) Área preóptica media del hipotálamo (mPOA)
- c) Núcleo de la base de la estría terminal (BNST)
- d) Núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH)
- e) Núcleo accumbens (NAcc).

Dichas áreas fueron procesadas mediante la técnica de inmunohistoquímica que se describe a continuación:

1. 6 lavados con PBS (pH=7.4).
2. Incubación con una solución de borohidrato de sodio (*Sigma-Aldrich*) al 1%.
3. 10 lavados con PBS (pH=7.4).
4. Incubación con peróxido de hidrógeno (*Sigma-Aldrich*) al 1% y metanol (MeOH, *J.K. Baker*) al 26%.
5. 6 lavados con PBS (pH=7.4).
6. Incubación con el anticuerpo primario (Abcam ab209794), dilución 1:10000 por 38h horas a 4° C sin agitación.
7. 6 lavados con PBS (pH=7.4).
8. Incubación con el anticuerpo secundario (*Vectorlabs* BA-1000) dilución 1:600 por 1 hora.
9. 6 lavados con PBS (pH=7.4).
10. Incubación con solución A/B (*Vectastain Elite*, ABC Kit).
11. 3 lavados con PBS (pH=7.4) + 3 lavados con acetato de sodio (0.175 M, *Sigma-Aldrich*).
12. Incubación con una solución de diaminobencidina (*Vector Laboratories*).
13. 3 lavados con PBS (pH=7.4).

Finalmente, el tejido fue montado en portaobjetos gelatinizados para deshidratarse en una serie de soluciones con concentraciones de alcohol creciente (50%, 60%, 70%, 96 % y 100% etanol, *KaraI*) y xilol (100%, *Sigma-Aldrich*). Las láminas obtenidas se protegieron con medio de montaje (NeoMunt®) y cubreobjetos.

- Análisis cuantitativo de la inmunorreactividad a c-Fos

Para dar profundidad al análisis dentro de cada área cerebral se tomaron 5 laminillas y la expresión de c-Fos se contabilizó bilateralmente. En la tabla 2 se muestra el rango anteroposterior (en mm) con respecto a Bregma del atlas de Paxinos y Watson (1997) que se utilizó como referencia para delimitar la estructura y el área de cada una de ellas en milímetros cuadrados (mm²).

Tabla 2. Áreas analizadas, tamaño de la estructura (mm²), y rango antero-posterior de cada región cerebral

Área cerebral	Zona de interés (mm ²)	Rango AP de Bregma (mm)
BOA	0.18	-0.1 a -0.3
mPOA	0.4	-0.3 a -1.3
BNST	0.4	-0.5 a -1.0
VMH	0.25	-2.3 a 3.3
NAcc	1.49	2.7 a -0.7

Se tomaron microfotografías de cada área utilizando un microscopio óptico (Carl Zeiss Axiostar) y el programa Motic Images Plus 3.0 (X64). Una vez obtenidas las imágenes se procesaron mediante el software Image J (Fiji) para realizar el conteo de las células inmunorreactivas. Los resultados se expresan como número de células por milímetro cuadrado. Como se mencionó se incluyeron 4-5 animales por grupo de los que se realizó el conteo bilateral (en el hemisferio derecho e izquierdo) en cinco cortes anteroposteriores del número de células positivas a la expresión de c-Fos.

4.2.4 Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando el software GraphPad Prism 8.0. Los datos conductuales se presentan como la mediana y los rangos intercuartiles (i.q.r.). La ganancia de peso y los niveles de glucosa plasmática se presentan como la media \pm el error estándar de la media (SEM). Para comparar datos no paramétricos (conductuales) se utilizó la prueba de Wilcoxon; para analizar la diferencia entre grupos se realizó un análisis de varianza de una vía o dos vías (según el caso), seguido de la prueba de Dunn's o Holm-Sidak. La comparación de proporciones se hizo mediante la prueba F de Fisher. Para el análisis de la expresión de c-Fos en distintas áreas cerebrales, se realizó un análisis de varianza de dos vías seguido de la prueba de Tukey. Se consideró una diferencia significativa cuando $p < 0.05$.

VI. Resultados

A continuación, se presentan los resultados obtenidos para cada diseño experimental (hiperglucemia severa e hiperglucemia moderada) en cada una de las pruebas conductuales (preferencia de pareja, motivación sexual incentiva, preferencia por olores sexuales y olfacción relativa a olores de alimentos palatables) y el análisis de la actividad cerebral mediante la cuantificación de c-Fos.

5.1 Modelo hiperglucemia severa

En la tabla 3 se presenta la ganancia de peso corporal y los niveles de glucosa plasmática de todos los animales utilizados en este modelo de hiperglucemia, después de 10 días de la administración de STZ y del tratamiento con insulina, en hembras OVX tratadas con hormonas. Como se observa, las hembras tratadas con STZ no presentaron una ganancia de peso corporal similar a la del grupo control (prueba de Dunn, $p < 0.001$), además de tener hiperglucemia severa (prueba de Dunn, $p < 0.001$). Con la restitución de insulina estos parámetros fueron equiparables a los que muestra el grupo control (glucosa buffer: 121 ± 3 mg/dl vs insulina: 87 ± 4 mg/dl). A pesar de que parecería que el grupo tratado con insulina presenta niveles de glucosa menores que el grupo control, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (prueba de Dunn para comparaciones múltiples). Los resultados de los análisis de varianza de estos tres grupos fueron: ganancia de peso: $H=11.34$, $p=0.003$ y niveles de glucosa plasmática: $H=26.57$, $p < 0.001$.

Tabla 3. Ganancia de peso corporal y niveles de glucosa plasmática en el modelo de hiperglucemia severa.

	Ganancia de peso (g)	Glucosa plasmática (mg/dl)
Buffer (n=36)	35 ± 2	121 ± 3
STZ (n=39)	$4 \pm 3^{***}$	$524 \pm 14^{***, ###}$
STZ + INS (n=32)	23 ± 5	87 ± 4

Se presenta la media \pm EEM, STZ = estreptozotocina, STZ + INS=estreptozotocina + insulina ANOVA de una vía de Kruskal Wallis (ver texto) seguido de la prueba de Dunn para comparaciones múltiples, *** $p < 0.001$ vs. grupo tratado con buffer, ### $p < 0.001$ vs. grupo tratado con STZ+insulina

5.1.1 Pruebas conductuales

- Prueba de preferencia de pareja

La figura 10 muestra el tiempo que las hembras OVX (suplementadas con hormonas, benzoato de estradiol más progesterona) y tratadas con buffer, STZ o STZ+INS permanecieron en el compartimento en el que hay un macho SE o CA. Como era de esperarse las hembras del grupo control invirtieron más tiempo explorando el compartimento donde hay un macho SE en comparación con el tiempo que invierten en el compartimento del macho CA (prueba t de Wilcoxon, $p < 0.01$). Este patrón conductual no fue observado en los animales tratados con STZ, las hembras con hiperglucemia severa permanecen un tiempo similar interactuando con ambos estímulos (SE o CA) (prueba t de Wilcoxon, $p = 0.240$). La administración de insulina revirtió los efectos de la STZ y las hembras permanecieron más tiempo en el compartimento de un macho SE (prueba t de Wilcoxon, $p < 0.05$). En esta prueba también se evaluó el tiempo de permanencia en el compartimento neutro, no se encontró diferencia significativa entre el tiempo de permanencia del grupo control (mediana 193 s, i.q.r.: 158-231) y del grupo tratado con STZ (mediana: 241 s, i.q.r.: 142-278). Sin embargo, se presentó un incremento en el tiempo que las hembras tratadas con STZ + insulina permanecieron en el compartimento neutro (mediana: 329 s, i.q.r.: 211-386) comparadas con el grupo control (prueba de Dunn, $p < 0.05$).

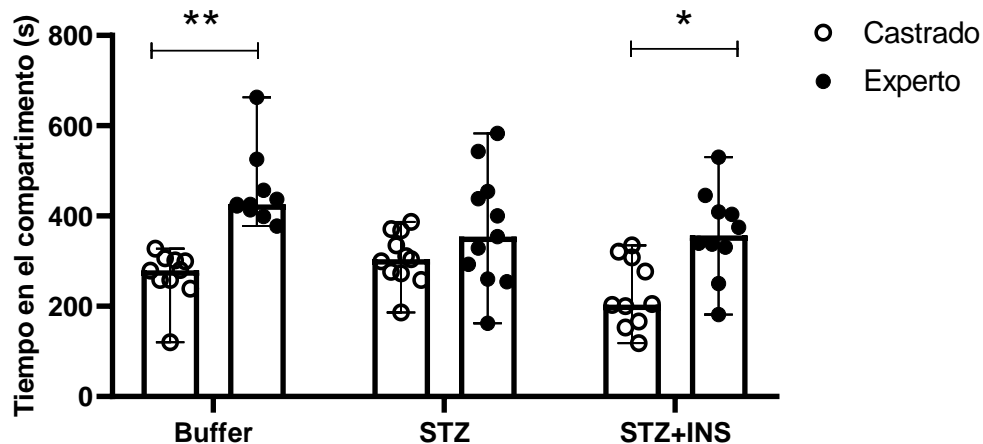


Figura 10. Tiempo acumulado que las hembras permanecen en el compartimento donde se encuentra un macho SE o CA.

Buffer: n= 10, STZ: n= 10, STZ+INS: n=10. Los datos son expresados como las medianas y rangos intercuartiles (i.q.r.), prueba t de Wilcoxon, * p<0.05, ** p<0.01 vs. tiempo en compartimento de macho castrado. STZ: estreptozotocina, STZ+INS: estreptozotocina +insulina.

En esta prueba también se evaluó la conducta sexual presentada por las hembras (ver tabla 4). El análisis estadístico demostró que no existe diferencia entre el número de montas que recibieron las hembras de todos los grupos (prueba de Dunn, p= ns.). Las hembras con hiperglucemia severa presentaron una disminución en el cociente de lordosis (prueba de Dunn, p < 0.05) y el tratamiento con insulina fue suficiente para restaurar este valor. Respecto a la proceptividad no se encontraron cambios en el grupo tratado con STZ, respecto a lo mostrado por el grupo control; sin embargo, se encontró un aumento en el número de estas conductas tras la administración de insulina crónica (prueba de Dunn, p < 0.05). Finalmente, no hubo diferencia en el número de conductas de rechazo presentadas por los 3 grupos evaluados (prueba de Dunn, p= ns). Estos datos son congruentes con observaciones previas (Hernández-Munive et al., 2018).

Tabla 4. Conducta sexual de las hembras evaluadas (Buffer, STZ, STZ+ INS) en PP.

	Número de montas recibidas	Cociente de lordosis	Número de eventos porceptivos	Número de eventos agresivos
Buffer (=10)	8 (7-9)	100 (100-100)	7 (0-21)	2 (0-5)
STZ (n=11)	6 (5-8)	60 ** (18-92)	4 (0-6)	2 (1-11)
STZ +INS (n=10)	8 (7-11)	100 (73-100)	20+** (6-35)	2 (0-8)

Se presenta la mediana y los rangos intercuartiles. STZ = estreptozotocina, STZ + INS=estreptozotocina + insulina. ANOVA de una vía de Kruskal Wallis, seguido de la prueba de Dunn para comparaciones múltiples, + $p < 0.05$ vs. grupo tratado con buffer, ** $p < 0.01$ vs. grupo tratado con STZ

- Prueba de motivación sexual incentiva.

La figura 11 muestra el tiempo acumulado que las hembras tratadas con buffer, STZ o STZ +INS permanecieron en las zonas incentivas adyacentes a un estímulo. El grupo control permaneció más tiempo en el área cercana a un macho SE (prueba t de Wilcoxon, $p < 0.01$) comparada con el tiempo que permaneció en el área adyacente a un macho CA. En contraste, las hembras tratadas con STZ permanecieron tiempos similares en ambas zonas incentivas (prueba t de Wilcoxon, $p=0.413$). No obstante, cuando las hembras con hiperglucemia severa recibieron insulina de manera crónica, éstas presentaron un patrón conductual similar al del grupo control, incrementando el tiempo de permanencia en la zona incentiva del macho SE (prueba t de Wilcoxon, $p < 0.05$).

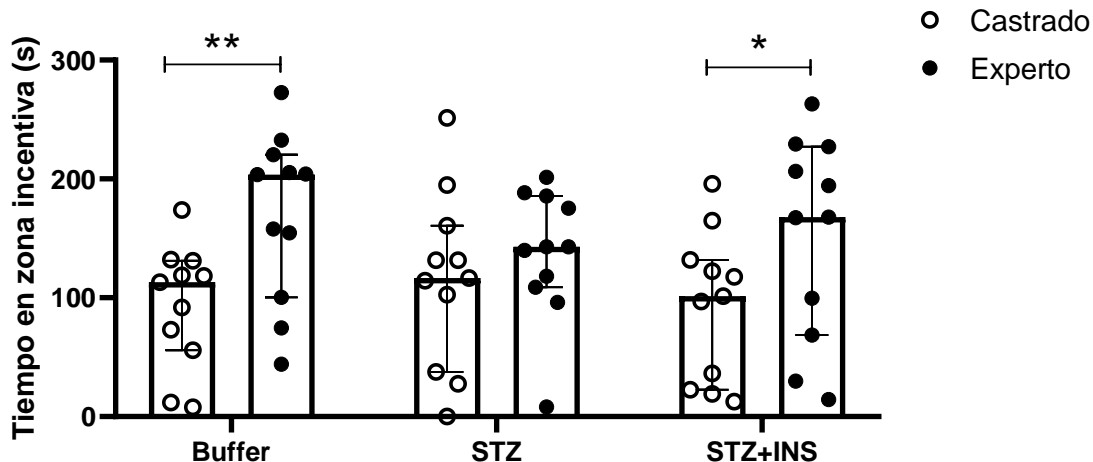


Figura 11. Tiempo acumulado que las hembras permanecieron en la zona incentivada.

Buffer: n=11, STZ: n=11, STZ+INS: n=11. Los datos son expresados como las medianas y rangos intercuartiles (i.q.r.), prueba t de Wilcoxon, * p<0.05 vs. tiempo en la zona adyacente a un macho castrado. STZ: estreptozotocina, STZ+INS: estreptozotocina +insulina.

- Prueba de preferencia por olores sexuales.

Cuando a las hembras se les da la opción de elegir entre el aserrín impregnado con olores de un macho SE o de un macho CA, los animales del grupo control pasaron más tiempo olfateando el aserrín proveniente de una caja donde habitaron machos SE (prueba t de Wilcoxon, p< 0.05) comparado con el tiempo de olfateo del aserrín de un macho castrado. En el grupo tratado con STZ, esta diferencia de tiempos no existió (prueba t de Wilcoxon, p= 0.121); es decir, olfatearon ambos aserrines el mismo tiempo. De manera interesante, la restitución con insulina al grupo tratado con STZ provocó un incremento en el tiempo de olfateo del aserrín con olores de macho SE (prueba t de Wilcoxon, p<0.05) (figura 12) en comparación con el tiempo de olfateo del aserrín de machos castrados.

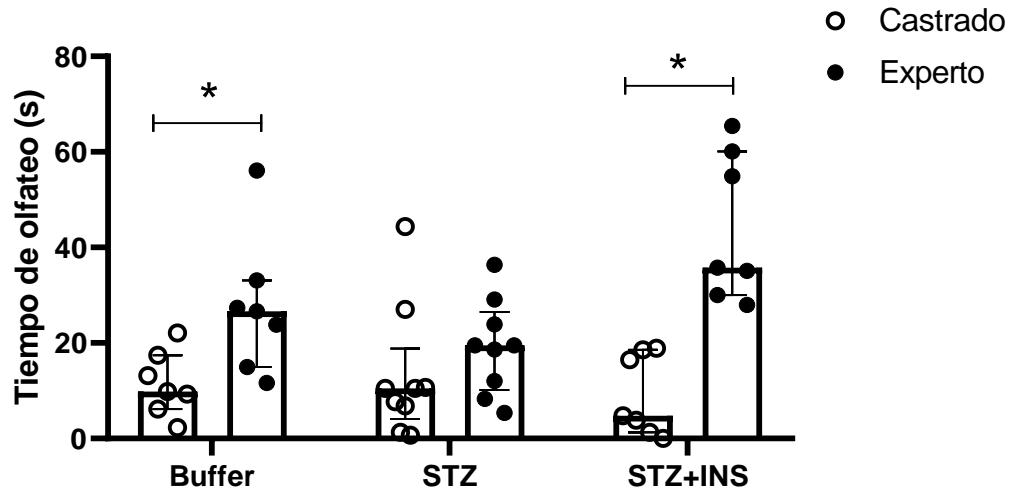


Figura 12. Tiempo acumulativo que las hembras permanecieron olfateando el aserrín de macho SE o CA

Buffer n=7, STZ n=9, STZ+INS: n=7. Los datos son expresados como las medianas y rangos intercuartiles (i.q.r.), prueba t de Wilcoxon, * p<0.05 vs. tiempo de olfateo del aserrín de machos castrados. STZ: estreptozotocina, STZ+INS: estreptozotocina +insulina.

- Prueba de olfacción relativa a alimentos palatables.

Siete de las 8 hembras control evaluadas encontraron el chocolate oculto en la caja en menos de 5 minutos (tabla 5). La misma proporción de hembras tratadas con STZ encontraron el chocolate (6/8) (Prueba de Fisher, ns). De manera similar, no existió diferencia entre ambos grupos en la latencia al encontrarlo (158 ± 40 s, para el grupo tratado con buffer vs 187 ± 53 s para el grupo tratado con STZ, prueba U de Mann-Whitney, $p=0.128$). Debido a que la hiperglucemia no tuvo un efecto en la habilidad para encontrar comida palatable no se realizó el grupo tratado con STZ + insulina.

Tabla 5. Proporción de hembras y latencia en que las hembras desentierran el chocolate en el modelo de hiperglucemia moderada

	Buffer	STZ
Proporción de hembras que encontraron el chocolate	7/8	6/8
Latencia (tiempo en seg)	158 ± 40	187 ± 53

Buffer n=6, STZ n= 8.

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

La figura 13 (panel **A**) muestra el análisis cuantitativo de la expresión de c-Fos en el bulbo olfatorio accesorio (BOA) de los distintos grupos experimentales. Las hembras tratadas con STZ, presentan una disminución en la expresión de c-Fos en comparación a la presentada por el grupo tratado con buffer (tratamiento: $F_{(1,303)}= 118.4$, $p<0.001$). Sin embargo, no existió diferencia significativa en la expresión de c-Fos en respuesta a un estímulo (macho sexualmente experto o macho castrado) o en ausencia de un animal estímulo (estímulo $F_{(2,303)}= 2.188$, $p=0.1139$). De manera sorprendente en el grupo tratado con buffer no existió un incremento en la expresión de c-Fos cuando las hembras se expusieron al macho sexualmente experto. Es decir, la exposición al estímulo no provocó diferencias significativas en la expresión de c-Fos en ninguno de los dos grupos principales (buffer o STZ). Sin embargo, sí hubo una interacción significativa entre estos dos factores (tratamiento y estímulo) (interacción: $F_{(2,303)}= 3.832$, $p=0.0227$).

En el núcleo del lecho de la estría terminal (figura 13, panel **B**), el análisis de varianza de dos vías también mostró un efecto dado por el tratamiento ($F_{(1,339)}= 31.89$, $p<0.0001$), pero no por el estímulo ($F_{(2,339)}= 2.182$, $p=0.1144$), sin que existiera una interacción entre ambos factores ($F_{(2,339)}= 2.023$, $p=0.1339$). No se encontraron diferencias significativas en las células inmunorreactivas a c-Fos en el BNST para el grupo tratado con buffer vs STZ, cuando no existe un estímulo presente; sin embargo, existió una

disminución en la expresión de c-Fos para las hembras tratadas con STZ frente a un macho castrado ($p < 0.001$) o frente a un macho sexualmente experto ($p < 0.05$).

Al analizar el número de células inmunoreactivas a c-Fos (ir-cFos) en el área preóptica media del hipotálamo (mPOA) (figura 13, panel **C**) el análisis de varianza de 2 vías mostró un efecto por el tratamiento -buffer o STZ-: (tratamiento: $F_{(1,341)} = 82.56$, $p < 0.001$); sin embargo, no hubo efecto por el estímulo presentado (estímulo: $F_{(2,341)} = 1.042$, $p = 0.3537$), sin presentarse interacción entre los factores evaluados (interacción: $F_{(2,341)} = 1.295$, $p = 0.2753$). Todos los grupos tratados con STZ (frente a SE, frente a CA o sin estímulo) presentaron una disminución en la expresión de c-Fos, al compararse contra su grupo control.

Respecto al área ventromedial del hipotálamo (VMH), el ANOVA de dos vías demostró un efecto significativo en el tratamiento ($F_{(1,308)} = 58.49$, $p < 0.001$), la presencia del estímulo ($F_{(2,308)} = 4.459$, $p = 0.0123$) y una interacción entre ambos factores ($F_{(2,308)} = 7.166$, $p = 0.001$). Claramente, en animales tratados con buffer hubo una menor expresión de células inmunorreactivas a c-Fos en aquéllos que se expusieron a los estímulos en comparación con el grupo que no se expuso (fig 13, barras blancas, panel **D**). Además, en esta zona cerebral, al igual que en varias anteriores, la exposición a STZ redujo la expresión de c-Fos en todas las condiciones, i.e., en animales expuestos a machos castrados o expertos o aún sin haber sido expuestos a un estímulo. Esta reducción, sin embargo, parece ser mucho mayor en animales no expuestos al estímulo que en aquéllos expuestos al macho sexualmente experto. Es importante señalar, que en ninguna de las áreas cerebrales evaluadas en el grupo control, hubo una expresión diferencial en la expresión de c-Fos cuando se les presentó un estímulo sexualmente relevante o un estímulo social y se comparó con la expresión de este marcador neuronal sin la presencia de un estímulo.

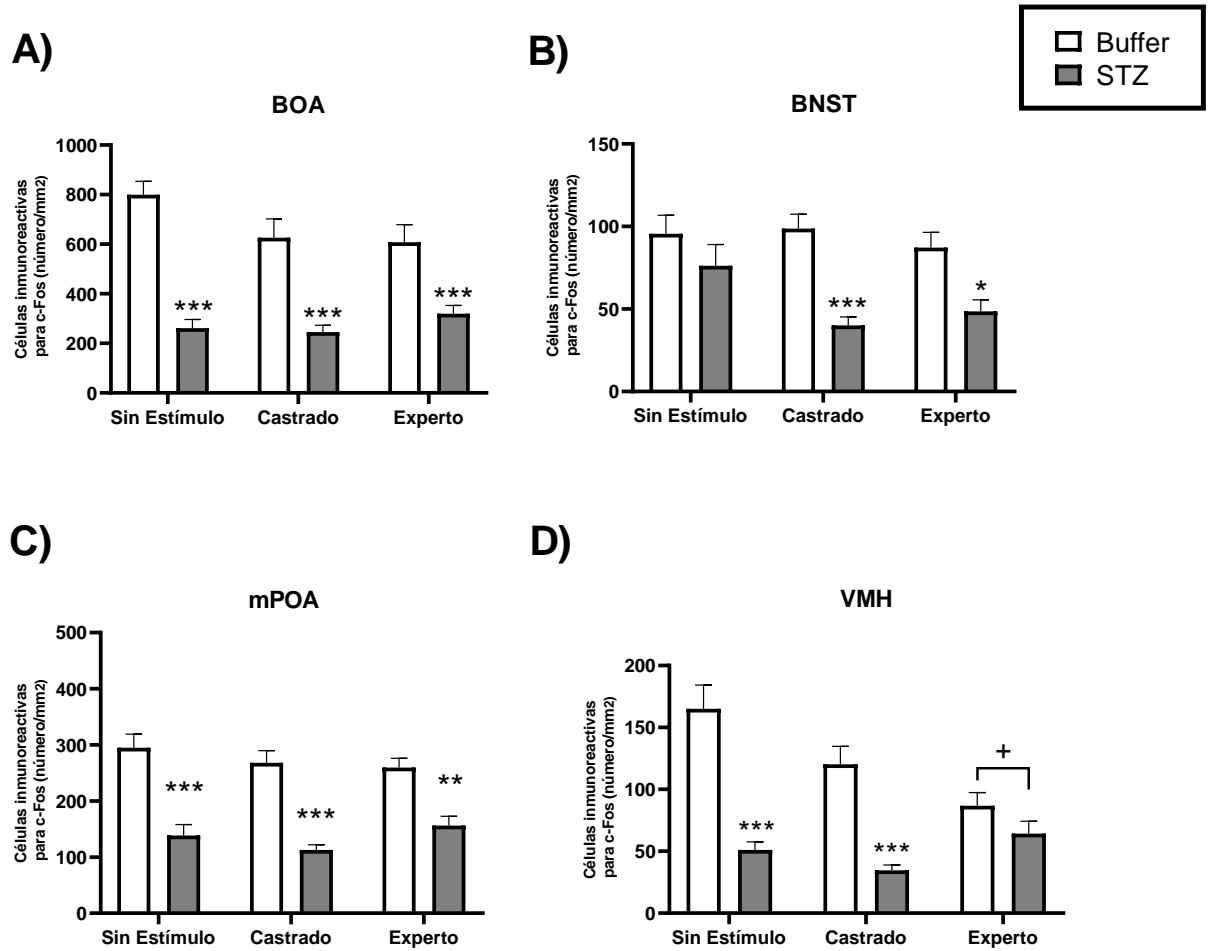


Figura 13. Densidad de c-Fos (# células positivas/ área evaluada) en áreas cerebrales involucradas en la vía olfatoria de hembras en el modelo de hiperglucemia severa

Los datos son expresados como la media \pm EEM, ANOVA de dos vías (ver texto), seguido de la prueba de Tukey, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. Buffer, + $p < 0.05$ vs. buffer sin estímulo. BOA: bulbo olfatorio accesorio, BNST: núcleo de la base de la estría terminal; MPOA: área preóptica media del hipotálamo, VMH: área ventromedial, STZ: estreptozotocina. Buffer: sin estímulo N=5, frente a un macho castrado N=5, frente a un macho sexualmente experto N=5, STZ: sin estímulo N=5, frente a un macho castrado N=5, frente a un macho sexualmente experto N=5.

Núcleo accumbens (core)

Cómo se mencionó en la introducción, el núcleo accumbens no es parte de la vía olfatoria accesoria, pero participa muy importantemente en la regulación de la motivación sexual femenina. Al medir la ir-cFos en el núcleo accumbens (figura 14) el ANOVA de 2 vías mostró un efecto del tratamiento ($F_{(1,264)}= 88.33, p<0.001$). , del estímulo ($F_{(2,264)}= 5.933, p=0.003$), pero no una interacción entre los factores ($F_{(2,264)}= 2.971, p=0.0529$). El número de células inmunorreactivas (figura 14) de los animales tratados con STZ fue menor en comparación a las presentadas por el grupo tratado con buffer en las tres condiciones: sin la presencia de un estímulo ($p < 0.001$), si se presentó un estímulo social ($p < 0.001$) o si el estímulo fue sexual ($p < 0.05$).

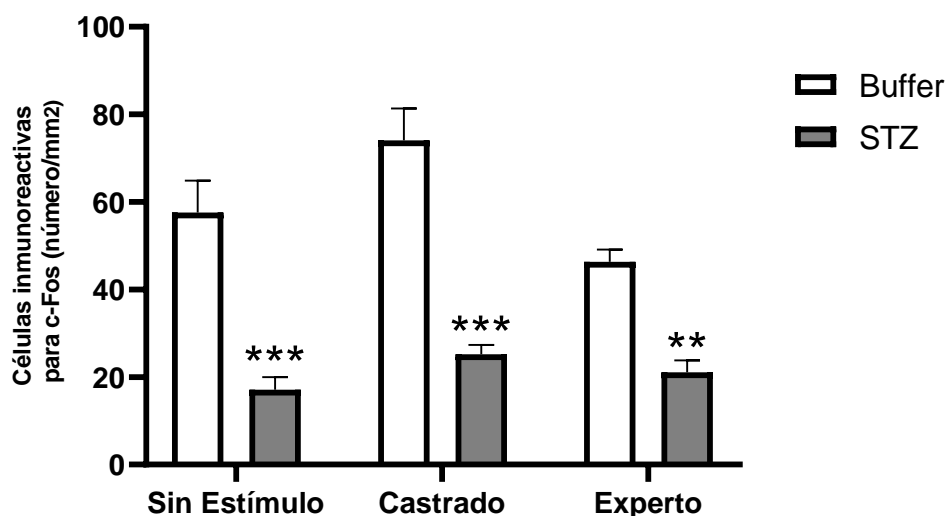
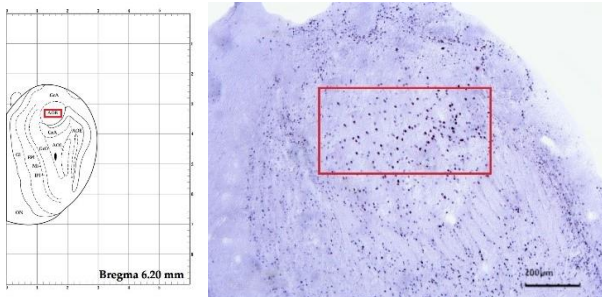


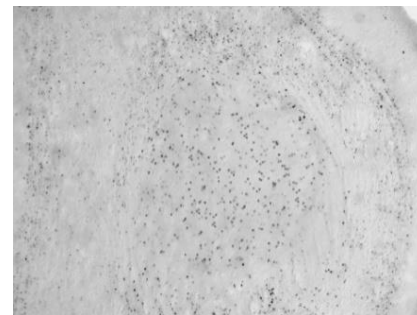
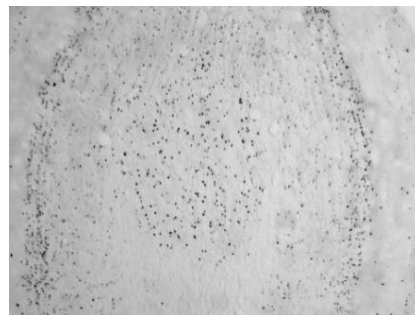
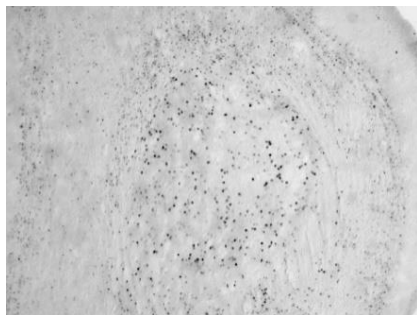
Figura 14. Densidad de c-Fos (# células positivas/ área evaluada) en el NAcc (core) de hembras en el modelo de hiperglucemia severa

Los datos son expresados como la media \pm EEM, ANOVA de dos vías (ver texto), seguido de Tukey test, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ vs. buffer. STZ: estreptozotocina. (Buffer: sin estímulo $N=4$, frente a un macho castrado $N=4$, frente a un macho sexualmente experto $N=4$, STZ: sin estímulo $N=4$, frente a un macho castrado $N=4$, frente a un macho sexualmente experto $N=4$).

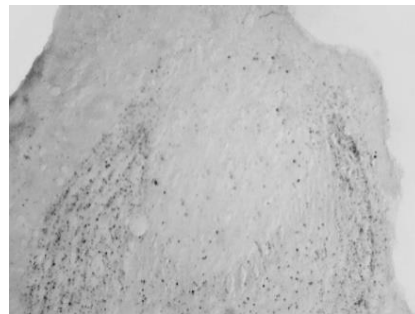
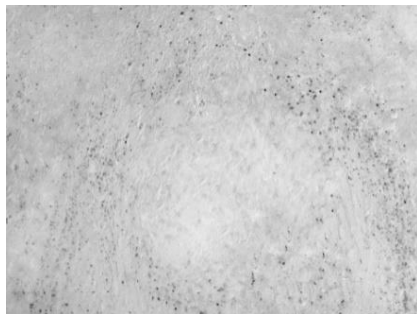
Las figuras 15 a 19 muestran varias fotomicrografías representativas de la expresión de c-Fos en distintas áreas cerebrales en las dos condiciones (hembras tratadas con buffer o con STZ) y expuestas a diferentes estímulos (sin estímulo, macho castrado y macho sexualmente experto). Además, con fines de orientación, se muestra la lámina correspondiente del atlas de Paxinos y Watson (1997) y una microfotografía de una tención de Nissl que sirvió para delimitar la zona de interés donde se realizó el contenido celular.



BUFFER



STZ



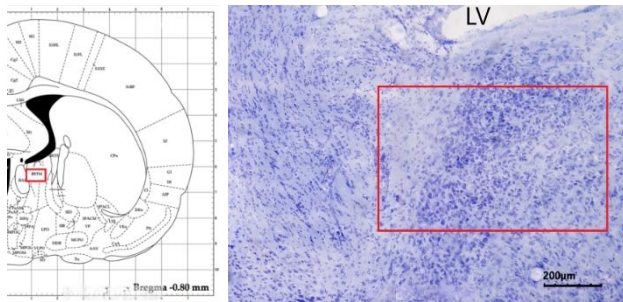
Sin estímulo

Con macho castrado

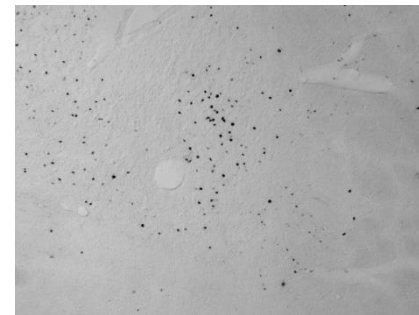
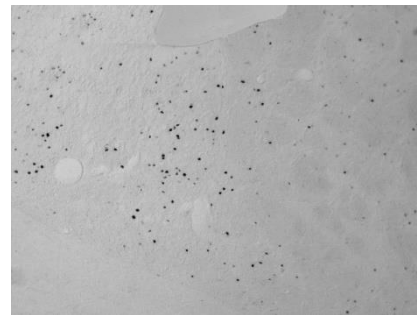
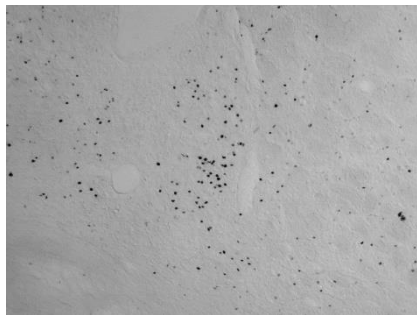
Con macho experto

Figura 15. Fotomicrografías representativas de la activación de c-Fos en BOA de hembras tratadas con buffer o STZ sin un estímulo, frente a un macho castrado o frente a un macho experto.

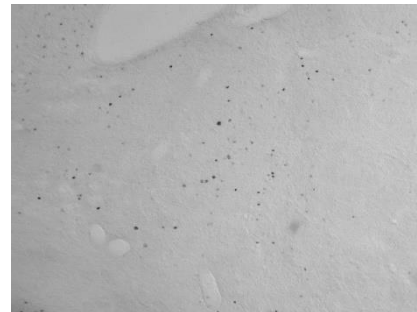
La imagen del atlas fue obtenida de Paxinos and Watson 1997. Rectángulo rojo corresponde al ROI.



BUFFER



STZ



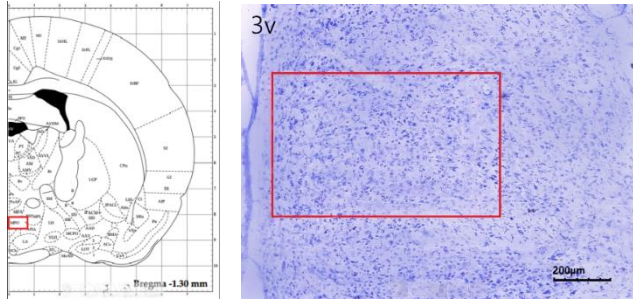
Sin estímulo

Con macho castrado

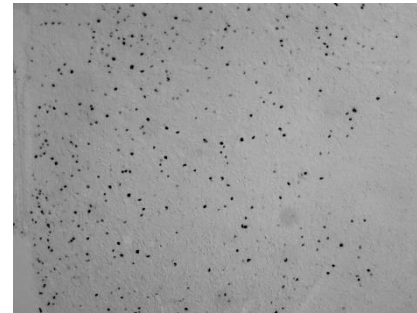
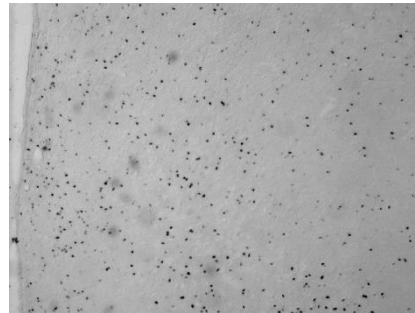
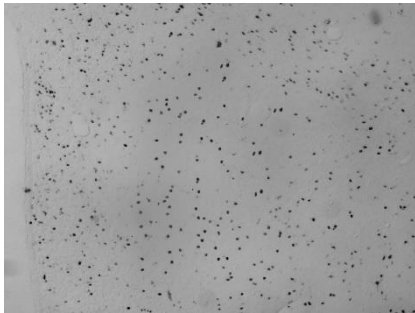
Con macho experto

Figura 16. Fotomicrografías representativas de la activación de c-Fos en BNST de hembras tratadas con buffer o STZ sin un estímulo, frente a un macho castrado o frente a un macho experto.

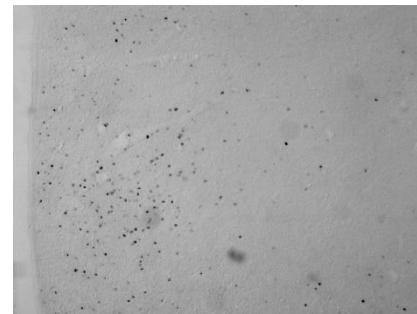
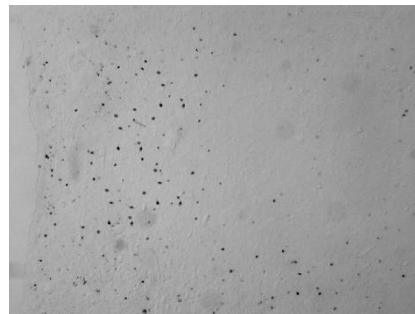
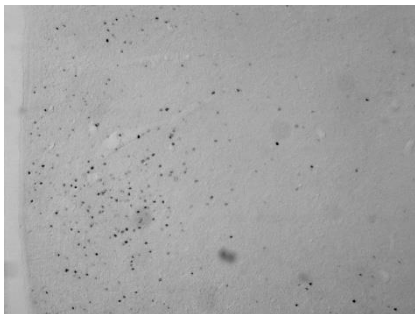
La imagen del atlas fue obtenida de Paxinos and Watson 1997. Rectángulo rojo corresponde al ROI. LV: Ventrículo Lateral.



BUFFER



STZ



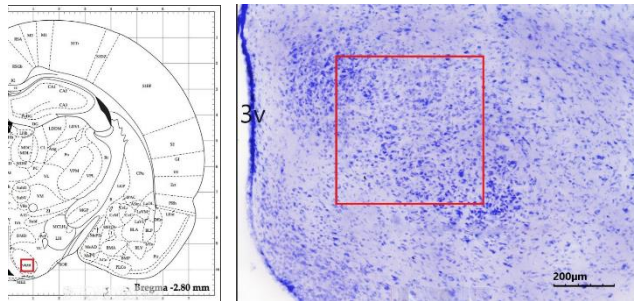
Sin estímulo

Con macho castrado

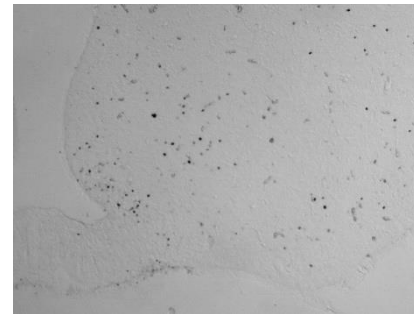
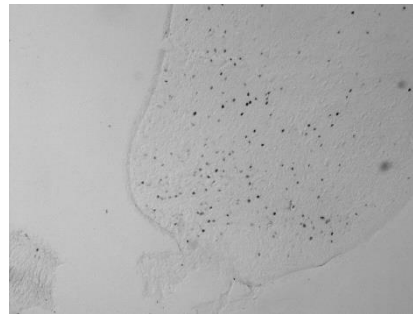
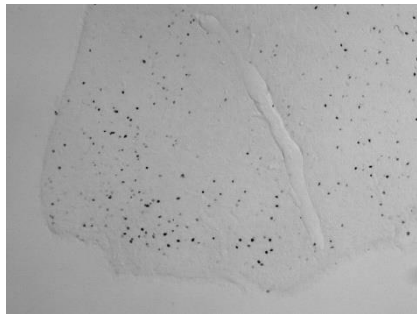
Con macho experto

Figura 17. Fotomicrografías representativas de la activación de c-Fos en mPOA de hembras tratadas con buffer o STZ sin un estímulo, frente a un macho castrado o frente a un macho experto.

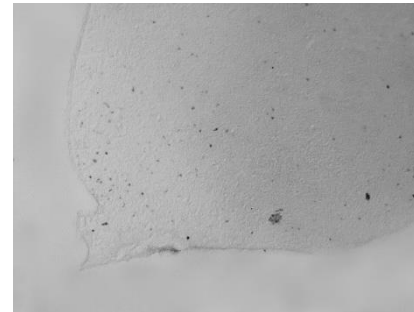
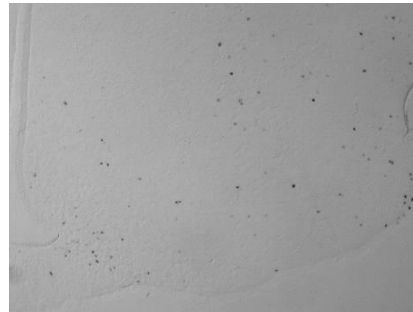
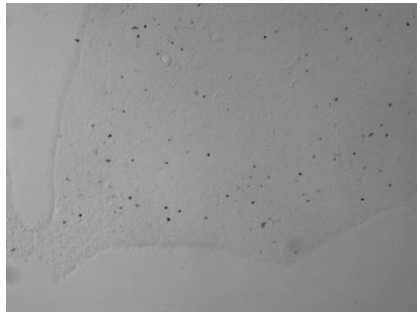
La imagen del atlas fue obtenida de Paxinos and Watson 1997. Rectángulo rojo corresponde al ROI. 3V: Tercer Ventrículo.



BUFFER



STZ



Sin estímulo

Con macho castrado

Con macho experto

Figura 18. Fotomicrografías representativas de la activación de c-Fos en VMH de hembras tratadas con buffer o STZ sin un estímulo, frente a un macho castrado o frente a un macho experto.

La imagen del atlas fue obtenida de Paxinos and Watson 1997. Rectángulo rojo corresponde al ROI. 3V: Tercer Ventrículo.

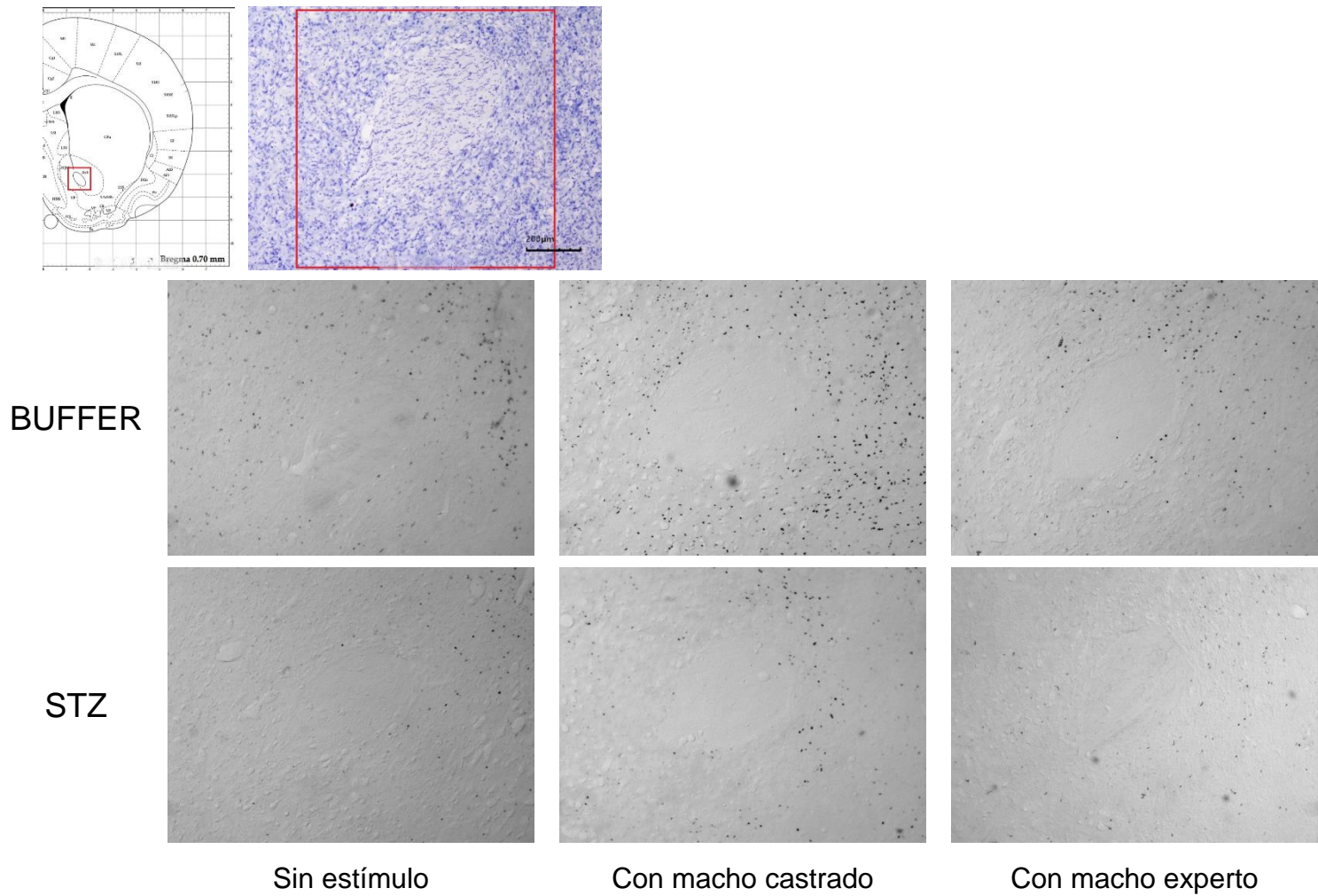


Figura 19. Fotomicrografías representativas de la activación de c-Fos en NAcc (core) de hembras tratadas con buffer o STZ sin un estímulo, frente a un macho castrado o frente a un macho experto.
 La imagen del atlas fue obtenida de Paxinos and Watson 1997. Rectángulo rojo corresponde al ROI.

5.2 Modelo hiperglucemia moderada

Como se mencionó anteriormente se utilizó un modelo de DM2, la administración de STZ en la etapa neonatal. Este modelo presenta niveles moderadamente elevados de glucosa. A continuación, se presentan los resultados obtenidos en este modelo.

a) Prueba de tolerancia a la glucosa

La administración de la solución de sacarosa produjo un aumento significativo de la concentración de glucosa plasmática en el grupo administrado con STZ en la etapa neonatal a los 30, 60 y 90 min post-carga (tiempo: $F_{(4,244)} = 42.98$, $P < 0.001$; tratamiento: $F_{(1,61)} = 42.25$, $P < 0.001$; interacción: $F_{(4,244)} = 17.50$, $P < 0.001$) en comparación con el grupo administrado con buffer. Los niveles de glucosa plasmática no regresaron a los valores basales a los 120 min post-carga en el grupo tratado con STZ (Figura 20).

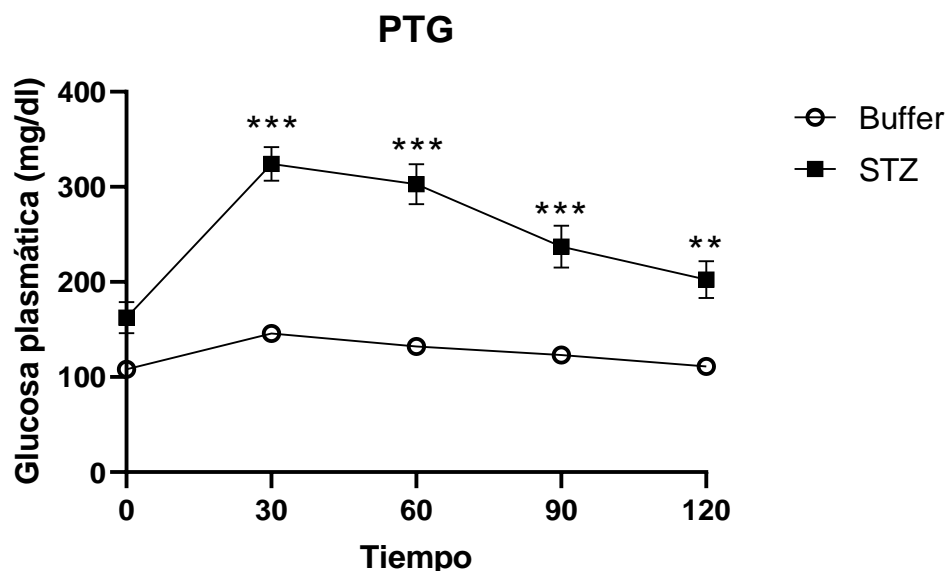


Figura 20. Curso temporal de la prueba de tolerancia a la glucosa tras la administración oral de sacarosa [2 g/kg] en animales administrados con buffer (n=28) o STZ en etapa neonatal (n=35).

Se presenta la media \pm SEM, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. grupo control, ANOVA de dos vías seguido de la prueba Holm- Sidak.

b) Glucosa aleatoria

Los resultados de la toma de glucosa aleatoria (la medición se realizó en cualquier momento del día, sin retirar el alimento -tabla 6-) demostraron que los animales administrados con STZ en la etapa neonatal presentaron valores significativamente superiores de glucosa que las hembras tratadas con buffer ($p < 0.001$).

Tabla 6. Valores de glucosa aleatoria de hembras adultas tratadas con buffer o STZ en la etapa neonatal

	Buffer	STZ
Glucosa aleatoria	116±3	180±20***

Se presenta el promedio \pm EEM, Buffer (n=28), STZ (n=35). STZ = estreptozotocina. Mann Whitney test, *** $p < 0.001$ vs. grupo tratado con buffer.

5.2.1 Pruebas conductuales

- Prueba de preferencia de pareja

En esta prueba, las hembras administradas con buffer en etapa neonatal y que se probaron en proestro natural cuando adultas, permanecieron más tiempo en el compartimento donde se encontraba el macho con experiencia sexual, en comparación del tiempo que permanecieron con un macho castrado (prueba t de Wilcoxon, $p < 0.05$). De manera interesante, la administración de STZ en la etapa neonatal no modificó la preferencia de las hembras adultas, ya que permanecieron más tiempo en el compartimento del macho experto vs el tiempo con el macho castrado (prueba t de Wilcoxon, $p < 0.05$).

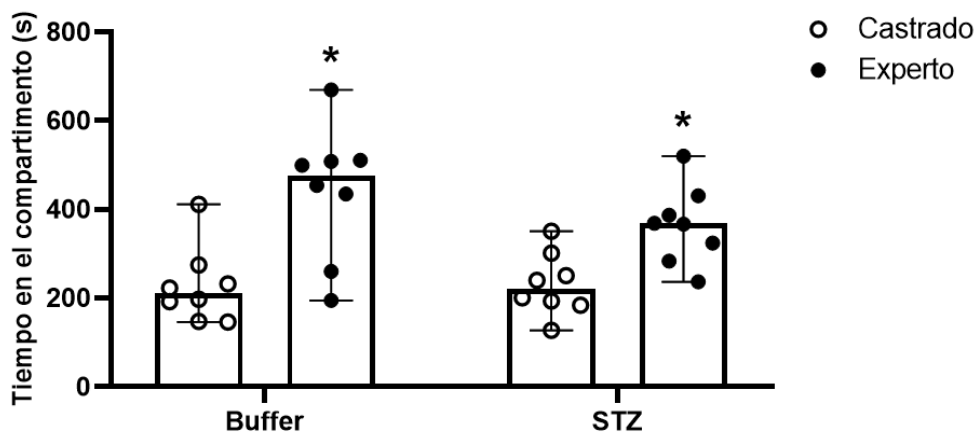


Figura 21. Tiempo acumulado que las hembras permanecen en el compartimento donde se encuentra un macho SE o CA. (Buffer n=8, STZ n=8)

Los datos son expresados como las medianas y rangos intercuartiles (i.q.r.), prueba t de Wilcoxon, * $p < 0.05$ vs. tiempo en compartimento de macho castrado. STZ: estreptozotocina.

La PP permite evaluar la conducta sexual presentada por la hembra. En cuanto al número de montas que recibieron los grupos experimentales el análisis estadístico demostró que no hubo diferencia entre los grupos evaluados (prueba Mann-Whitney, $p = ns.$). Las hembras con hiperglucemia moderada no presentaron cambios ni en el QL ($p = ns.$), el número de conductas proceptivas ($p = ns.$) ni en el número de conductas agresivas ($p = ns.$) respecto a lo observado en el grupo tratado con buffer en la etapa neonatal. Estos datos coinciden con observaciones previas (Hernández-Munive et al., 2019).

Tabla 7. Conducta sexual de las hembras evaluadas en la prueba de PP (Buffer, STZ).

	Número de montas recibidas	Cociente de lordosis	Número de eventos proceptivos	Número de eventos agresivos
Buffer (n=8)	15 (8-12)	100 (100-100)	15 (5-12)	3 (0-2)
STZ (n=8)	12 (9-12)	95 (90-100)	13 (9-13)	5 (1-4)

Se presenta la mediana y los rangos intercuartiles. STZ = estreptozotocina, STZ + INS=estreptozotocina + insulina ANOVA de una vía de Kruskal Wallis, seguido de la prueba de Dunn para comparaciones múltiples.

- Prueba de motivación sexual incentiva.

El grupo tratado con buffer en la etapa neonatal y evaluado en proestro en la etapa adulta, permanece más tiempo cerca de un macho sexualmente experto (prueba t de Wilcoxon, $p < 0.05$). Esta diferencia no se presenta en las hembras tratadas con STZ en la etapa neonatal, las cuales permanecen tiempos similares en la vecindad de un macho castrado y uno sexualmente experto (prueba t de Wilcoxon, $p = 0.425$) (fig. 21).

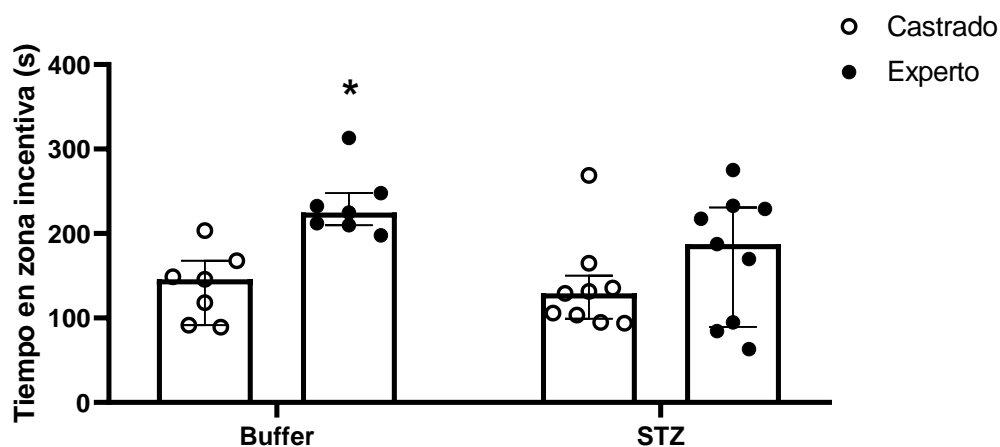


Figura 22. Tiempo acumulado que las hembras permanecieron en la zona incentiva (Buffer n=8, STZ n=9).

Los datos son expresados como las medianas y rangos intercuartiles (i.q.r.), Wilcoxon t-test, * $p < 0.05$ vs. tiempo en la zona adyacente a un macho castrado. STZ: estreptozotocina.

- Prueba de preferencia por olores sexuales.

Cuando se les permite a las hembras elegir entre el aserrín impregnado con olores de un macho sexualmente experto o de uno castrado, las hembras tratadas con buffer permanecen más tiempo olfateando el aserrín del macho sexualmente experto (prueba t de Wilcoxon, $p < 0.05$); de igual manera, las hembras con hiperglucemia moderada permanecen más tiempo olfateando el aserrín de un macho experto (prueba t de Wilcoxon, $p < 0.05$) (figura 23).

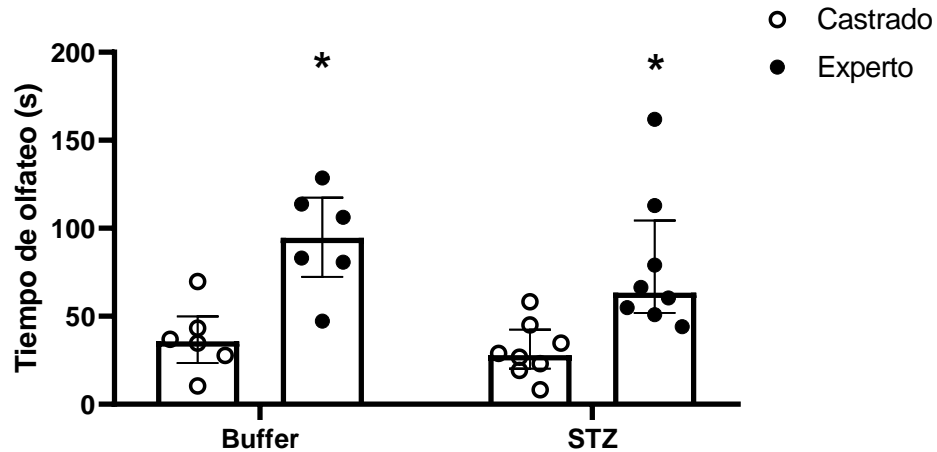


Figura 23. Tiempo acumulativo que las hembras permanecieron olfateando el aserrín de macho SE o CA (Buffer n=6, STZ n=8).

Los datos son expresados como las medianas y rangos intercuartiles (i.q.r.), prueba t de Wilcoxon, *p<0.05 vs. tiempo en olfateando aserrín de macho castrado. STZ: estreptozotocina.

- Prueba de olfacción relativa a alimentos palatables.

En esta prueba, el 100% de los animales encontró el pedazo de chocolate oculto en el aserrín (p=ns, Fisher test), de igual forma no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las latencias de desentierro (tabla 8).

Tabla 8. Proporción de hembras y tiempo en que las hembras en el modelo de hiperglucemia moderada encontraron el chocolate en el aserrín (buffer n=6, STZ n= 10).

	Buffer	STZ
Proporción de hembras que encontraron el chocolate	6/6	10/10
Latencia (Tiempo en seg)	48 ± 9	63 ± 9

Finalmente, y a manera de resumen, en la tabla 9 se presentan los hallazgos obtenidos en esta investigación.

Tabla 9. Resumen de resultados en ambos modelos de hiperglucemia.

	Modelo hiperglucemia severa	Modelo hiperglucemia moderada
Preferencia de pareja	Se pierde la preferencia	Sin cambios
Motivación sexual incentiva	Se pierde la preferencia	Se pierde la preferencia
Olores sexuales	Se pierde la preferencia	Sin cambios
Olores palatables	Sin cambios	Sin cambios
Expresión de c-fos	Disminución	-

VII. Discusión

La discusión de los datos encontrados en esta investigación se divide en 3 secciones:

1. Evaluación conductual de la motivación sexual de hembras con hiperglucemia severa.
2. Evaluación de la expresión de c-Fos en distintas áreas cerebrales involucradas en la motivación sexual de hembras con hiperglucemia severa.
3. Evaluación conductual de la motivación sexual de hembras con hiperglucemia crónica-moderada.

6.1 Evaluación conductual de la motivación sexual de hembras con hiperglucemia severa

Los principales hallazgos de esta serie de experimentos fueron que las hembras con hiperglucemia severa presentan una disminución en la motivación sexual evaluada en los modelos de PP y MSI. Se observó que a diferencia del grupo control, las hembras con hiperglucemia severa permanecían el mismo tiempo en el compartimento/área adyacente donde se encontraba un macho sexualmente experto que en el compartimento/área adyacente que contenía a un macho castrado. De igual forma permanecen la misma cantidad de tiempo olfateando el aserrín proveniente de cajas donde se alojaron machos SE o CA, difiriendo del grupo tratado con buffer. Todos los cambios fueron restaurados tras la administración crónica de insulina. La hiperglucemia/hipoinsulinemia no afectó la habilidad para detectar olores provenientes de alimentos palatables.

6.1 Las hembras con hiperglucemia severa presentan una disminución en la motivación sexual.

Cómo se ha mencionado, el análisis de la motivación sexual de hembras con hiperglucemia no se había realizado de manera sistemática y los resultados obtenidos no permitían sacar una conclusión clara.

Hemos de recordar que en la prueba de PP la hembra tiene libre acceso a ambos estímulos: macho sexualmente experto y macho castrado, característica que le permite copular con el macho SE. Considerando la idea de que la cópula tiene componentes aversivos y gratificantes para la hembra (Broekman et al., 1988), podríamos proponer que los componentes aversivos pueden agravarse debido a la hiperglucemia severa (recordando que las hembras tratadas con STZ recibieron la misma cantidad de montas que el grupo de control), ya que se ha demostrado que la hiperglucemia genera fibrosis vaginal (Kim et al., 2006; Park et al., 2001), vulvodinia (G. Ali et al., 2015) y neuropatía (Banafshe et al., 2014; Gao & Zheng, 2014; Tripathi et al., 2016). Así, en la prueba de PP, el contacto físico puede producir nocicepción la cual enmascararía el comportamiento de la hembra evitando la correcta expresión de la motivación sexual. Asimismo, en este modelo, encontramos que el número de eventos proceptivos no se redujo en las hembras con hiperglucemia severa, observación que concuerda con reportes anteriores (Ahdieh et al., 1983; Hernández-Munive et al., 2018). Aunque algunos autores proponen que la proceptividad refleja la motivación sexual (Beach, 1976; Rivas & Mir, 1991), otros sugieren que estos comportamientos son estereotipados y completamente reflejos, ya que estas respuestas proceptivas pueden manifestarse en un contexto no sexual (Edwards et al., 1983) e incluso se ha propuesto que reflejan una respuesta a las acciones del macho más que la motivación sexual intrínseca de la hembra (Beach, 1976; Heijkoop et al., 2018). Por ello, se recomienda utilizar otros modelos como el de MSI, donde se evalúa la motivación

intrínseca por la búsqueda de un compañero sexual. Esta última prueba, además, no involucra el contacto físico entre los sujetos.

Algunos autores señalan que para que se tenga una correcta motivación sexual es necesaria la unión de dos componentes: las propiedades incentivas de los estímulos externos, y el estado de motivación central (que se refiere en la integración de señales fisiológicas y hormonales con los sustratos neurales que dirigirán el comportamiento) (Ågmo, 1999). Sobre estas bases, podemos plantear dos hipótesis para explicar la falta de motivación sexual de las hembras tratadas con STZ cuando adultas: la primera implica que las hembras hiperglucémicas no pueden distinguir las señales somatosensoriales emitidas por los machos, mientras que la segunda asume que la red neuronal o las hormonas esteroideas no logran ejercer su efecto central (retomaremos esta segunda hipótesis cuando se discutan los datos de actividad cerebral medida por c-Fos).

6.1.1 Hipótesis: La disminución en la motivación sexual de hembras con hiperglucemia severa se debe a una alteración en la percepción de olores sexualmente relevantes

En apoyo a esta posible explicación del porqué de la disminución de la motivación sexual en hembras con hiperglucemia severa, están nuestros resultados en la prueba de olfato para estímulos sexuales en la que se demostró que estas hembras pasan la misma cantidad de tiempo oliendo el aserrín de los machos SE y CA, lo que sugiere que el bulbo olfatorio accesorio podría estar afectado y ser esta la base de la falta de preferencia en las pruebas de PP y MSI. La alteración del olfato parece ser específica de las señales sexuales, ya que no se encontró diferencia en la proporción de hembras capaces de encontrar un alimento palatable, lo que sugiere un procesamiento deficiente del bulbo olfatorio accesorio, ya que se ha observado una activación selectiva de este órgano por parte de diversas feromonas (Inamura, Kashiwayanagi, et al., 1999; Inamura, Yuko, et al.,

1999). Mientras que para la detección de olores relativos a alimentos palatables es el bulbo olfatorio principal el que tiene una mayor participación en el procesamiento de dichos olores (Romero et al.1990).

Estudios recientes demostraron que las ratas macho tratadas con STZ exhiben una disminución en la discriminación de olores (Wakabayashi et al., 2016) y una reducción en la sensibilidad olfativa (Jing et al., 2017), evaluadas en una tabla de agujeros perfumada y en una prueba de enterramiento de pellets, respectivamente. Aunque a menudo se subestima, el sentido del olfato es importante para la vida sexual humana, ya que éste procesa los olores axilares o genitales que provocan cambios hormonales y activación hipotalámica (Lübke & Pause, 2015). Especialmente en las mujeres, el juicio sobre el atractivo y la elección de una pareja potencial parece depender de los olores corporales, más que de otras señales sensoriales (Havlicek et al., 2008; Herz & Cahill, 1997; Lübke & Pause, 2015). En consecuencia, los pacientes con problemas de olfato manifiestan con frecuencia problemas sexuales y sociales (Merkonidis et al., 2015). En la clínica, se ha informado que algunos pacientes con DM1 tienen una capacidad disminuida para identificar olores (le Floch et al., 1993; Weinstock et al., 1993); sin embargo, el análisis más profundo sobre la posible relación entre la reducción en la sensibilidad olfativa y el impacto sobre la vida sexual de las pacientes con DM no se ha realizado. De igual forma, se necesitan más experimentos para determinar si la disminución de la motivación sexual de las hembras tratadas con STZ se debe a una deficiencia para distinguir entre los estímulos olfativos, o a una mala interpretación de los estímulos a nivel central o a la suma de ambos factores.

6.1.3 La insulina restaura la motivación sexual de hembras con hiperglucemia severa

De manera interesante, la administración crónica de insulina en un esquema que normalizó los niveles de glucosa en sangre revirtió por completo el efecto deletéreo de la hiperglucemia/hipoinsulinemia en las pruebas de PP,

MSI y de olfacción relativa a olores sexuales, provocando que las hembras recuperaran el interés por el estímulo sexual. Desafortunadamente, desconocemos si la insulina revirtió los efectos de la administración de STZ por normalizar la hiperglucemia, la hipoinsulinemia o por una acción central directa. En relación con esto último, se sabe que la insulina glargina atraviesa la barrera hematoencefálica y, a pesar de su corta vida media en el líquido cefalorraquídeo (de Luis & Romero, 2013), puede actuar en sus receptores en el bulbo olfatorio, hipotálamo, corteza e hipocampo (Banks et al., 2012). En apoyo a una posible acción de la insulina a nivel central, se demostró que la lordosis es restaurada en hembras tratadas con STZ cuando se administró insulina directamente en el tercer ventrículo, una manipulación que no redujo la hiperglucemia (Kovacs et al., 2003), y que la normalización de los niveles de glucosa periférica (con el uso de una dieta restrictiva) era insuficiente para corregir la disminución de la lordosis y en la proceptividad observadas en las hembras tratadas con STZ (Karkanias et al., 1997). De hecho, se ha sugerido que la insulina juega un papel importante en la señalización del estrógeno en el hipotálamo anterior, que es esencial para la expresión del comportamiento sexual (Kovacs et al., 2003).

De igual forma, se ha demostrado que la insulina está involucrada en la regulación de la síntesis de dopamina (neurotransmisor asociado al aspecto motivacional de la cópula) (Sevak et al., 2008). Un estudio *in vivo*, demostró una disminución en la actividad del transportador de dopamina (DAT) en el estriado de ratas macho con hipoinsulinemia (Owens et al., 2005). Además, cuando se inhibe la enzima fosfatidilinositol, 3 quinasa (activada por la unión de la insulina a su receptor) se genera la internalización del DAT (Carvelli et al., 2002). Finalmente, se ha reportado que la administración intraperitoneal de insulina a machos normoglucémicos incrementó la liberación de dopamina en el núcleo accumbens (Potter et al., 1999). Sobre estas bases, especulamos que los efectos de la insulina aquí observados se pueden

deber a sus acciones centrales, y no a que corrigiera la hiperglucemia periférica. Se necesitan experimentos futuros para respaldar esta especulación.

6.1.4 Hipótesis: La disminución en la motivación sexual de hembras con hiperglucemia severa es debido a una disminución en la actividad neuronal a nivel central

En apoyo a que pudiera existir un fallo en la red neuronal o en las acciones de las hormonas a nivel central en hembras hiperglucémicas, hemos encontrado cuatro observaciones que fundamentan esta hipótesis:

a) Se ha observado que la transmisión dopaminérgica (crítica para la motivación sexual incentiva) (Georgiadis et al., 2012) está disminuida en el hipotálamo anterior y mediobasal de las hembras hiperglucémicas (Kienast et al., 1993).

b) La comunicación interneuronal entre el circuito mesolímbico (sitios donde el estradiol actúa para aumentar la motivación sexual (Micevych & Meisel, 2017), está disminuida en los animales tratados con STZ (Mohamadi et al., 2015).

c) La unión del estradiol a su receptor en el mPOA (un área del cerebro muy involucrada en la regulación de la motivación sexual) (Yang & Clemens, 2000) ya se ve afectada 24 horas después de la disminución de la insulina (Ahdieh et al., 1983).

d) En varias estructuras cerebrales (BOA, BNST, mPOA, VMH y NAcc) se observó una disminución en c-Fos en todos los grupos que tuvieron tratamiento con STZ (datos de la presente tesis) e incluso en otras áreas no relacionadas directamente con la respuesta sexual ni parte de la vía olfatoria accesoria, como el área paraventricular del hipotálamo (PVA) y el septum lateral (LSV) (datos no mostrados). Es decir, independientemente de la exposición a un estímulo social o sexual, o incluso sin que la hembra se expusiera a algún estímulo, existió una disminución de la actividad neuronal en sujetos hiperglucémicos. Sería importante señalar que se ha demostrado

que de manera basal (sin que los animales sean sometidos a ningún estímulo) existen cambios en la expresión de c-Fos en varias áreas cerebrales en animales tratados con STZ (Zheng et al., 2002), lo cual, podría estar influyendo desde un inicio en los resultados que observamos en esta serie experimental.

A favor de esta hipótesis del procesamiento central deficiente, un ensayo clínico reportó que un grupo de mujeres con DM1 presentó una menor respuesta fisiológica a los estímulos eróticos, mientras que las respuestas subjetivas (expresadas en un cuestionario) fueron comparables a las del grupo control (Wincze et al., 1993). Sin embargo, el número de mujeres incluidas en este estudio fue pequeño ($n = 7$), lo que invita a realizar más estudios. Es importante señalar que muchos de los resultados observados en estudios preclínicos no representan completamente lo que sucede en la clínica, por lo tanto, la interpretación de los datos debe ser tomada con precaución.

6.2 Evaluación de la expresión de c-Fos en distintas áreas cerebrales involucradas en la motivación sexual de hembras con hiperglucemia severa.

En el análisis de la expresión de c-Fos en el BOA de ratas con hiperglucemia severa se encontró una disminución en la expresión de esta proteína, lo cual nos indica un decremento en la actividad neuronal de esa zona (sin importar el estímulo que se utilice). Dicha disminución puede estar ligada a otros cambios conductuales que se presentan en estas hembras, ya que en otro experimento se demostró que lesionar el BOA disminuye la respuesta de lordosis y las conductas proceptivas en hembras OVX y suplementadas con hormonas (Dudley & Moss, 1994), tal como lo observado en las hembras con hiperglucemia severa (Hernández-Munive et al., 2018). No es de sorprender que encontráramos una disminución en la expresión de c-Fos en otras áreas cerebrales, sobre todo las que tienen una conexión directa con el BOA, como lo son el BNST, el mPOA y el VMH (de Olmos & Lennart,

1978). Si en el primer sitio de la vía se encuentra afectada la información sensorial también lo hará en los siguientes relevos de información.

Otra área en la que encontramos una disminución significativa en la expresión de c-Fos en hembras tratadas con STZ es el núcleo accumbens, sitio que se ha relacionado con el valor recompensante frente a conductas como la respuesta sexual, la conducta materna, la alimentación y el uso de drogas (Phillips & Blaha, 1993; Wise et al., 1995); sin embargo, con los datos obtenidos en esta investigación no es posible establecer si la disminución en la motivación de las hembras con hiperglucemia severa es debida a una falla en la neurotransmisión en el núcleo accumbens o a que esta área no recibe la información necesaria de otros sitios cerebrales encargados de interpretar los estímulos, como el BOA. Es necesario realizar más experimentos que nos permitan aclarar esta controversia.

De manera sorprendente en la presente tesis no se encontró activación de ningún área cerebral de las hembras control cuando se expusieron al macho SE. Este resultado negativo puede deberse, al menos, a dos factores importantes: la falta de experiencia sexual de las hembras y al tipo de estímulo y su duración. Con relación al primero, en esta parte del trabajo se utilizaron hembras sexualmente naive, ya que se pretendía relacionar estos resultados con los obtenidos en las diferentes pruebas conductuales (PP, MSI y de preferencia por olores sexualmente relevantes) en las que también se usaron ratas hembra sexualmente naive. En 2007, Hosokawa y Chiba demostraron que en hembras con experiencia sexual (obtenidas con al menos 3 pruebas sucesivas en las que recibieron al menos una eyaculación) la activación cerebral, medida por c-Fos, en respuesta a la exposición a olores sexualmente relevantes, ocurrió en varias áreas cerebrales: BOA, núcleo accumbens (core), mPOA, BNST, MeA y VMH; mientras que en hembras naive, sin experiencia sexual, esta activación sólo ocurrió en el bulbo olfatorio accesorio, el BNST y la MeA (posterodorsal).

De manera interesante, ambos grupos de ratas hembra (con y sin experiencia sexual) mostraron preferencia por olores de machos sexualmente expertos (vs los olores de otra hembra en estro). Después de estos resultados, los autores sugieren que las áreas cerebrales responsables de inducir la preferencia olfativa en hembras sexualmente naive son el BNST y la amígdala medial posterodorsal (Hosokawa & Chiba, 2007).

Con relación al segundo factor, la exposición al estímulo, se ha propuesto que la activación de c-Fos depende de la intensidad de la exposición al estímulo. Así, se ha demostrado que, si las hembras pueden interactuar y copular con el macho sexualmente activo, aumenta la densidad de c-Fos, en la MeA, BNST y VMH a diferencia de exponerlas sólo al aserrín de machos sexualmente activos (Dudley et al., 1992).

Además, la intensidad de la marca a c-Fos depende del tiempo de exposición al estímulo (mayor después de 180 minutos de exposición que de 60 minutos). En el presente trabajo se expuso a las hembras al macho estímulo durante 30 minutos durante los que no se permitió la interacción física de los sujetos, pero podían olerse, verse y escucharse. Este tiempo de exposición se seleccionó ya que se consideró que el macho (sexualmente experto o castrado) representaba un estímulo mucho más intenso que sólo el aserrín proveniente de su caja hogar y con base en resultados previos de nuestro laboratorio que muestran que este tiempo y forma de exposición al sujeto estímulo es capaz de promover la síntesis de c-Fos en varias estructuras cerebrales (Hernández-González, 2021). Cabe mencionar que no se permitió la interacción sexual, ya que se consideró que ésta enmascararía los resultados de activación de c-Fos, pues se sabe que la cópula induce la expresión de esta proteína en varias estructuras cerebrales (Coolen et al., 1996; Erskine, 1993) y el objetivo de nuestra investigación era la determinación de la activación de c-Fos considerando

sólo el aspecto apetitivo de la cópula. Con todos estos resultados, tomados en conjunto, es posible sugerir que la falta de expresión de la proteína c-Fos entre hembras no expuestas y aquéllas que se expusieron al macho (castrado o sexualmente experto) se debe a:

- (a) que las hembras utilizadas fueron sexualmente naive;
- (b) que el tiempo de exposición al estímulo fue demasiado breve (30 min).
- (c) a que el estímulo (macho SE detrás de una barrera) fue insuficiente para producir una activación cerebral mayor a la producida por la presencia de un macho CA.

Naturalmente, necesitamos hacer futuros experimentos para estudiar estas posibilidades.

6.3 Evaluación conductual de la motivación sexual de hembras con hiperglucemia moderada

El único cambio conductual observado en las hembras con hiperglucemia crónica moderada se presentó en el modelo de MSI donde las hembras no mostraron una preferencia por permanecer dentro del área adyacente de un macho SE vs. CA. En estudios anteriores, ya se habían observado cambios en algunas respuestas (pero no en todas) de las hembras con hiperglucemia moderada crónica ante un estímulo sexual. Por ejemplo, las hembras con hiperglucemia moderada naturalmente ciclantes muestran una disminución en la proceptividad comparadas con el número de eventos presentados por el grupo administrado con STZ en la etapa neonatal y que había sido OVX (cuando adultas) y suplementado con hormonas (Hernández-Munive, 2017).

Además, dichas hembras (naturalmente ciclantes, con hiperglucemia crónica moderada) tienen un cociente e intensidad de lordosis similares a

los del grupo control (Hernández-Munive et al., 2019; Inhasz et al., 2013); sin embargo, no realizan la conducta de “*pacinig*” (Hernández-Munive et al., 2019). En dicho estudio las hembras con hiperglucemia crónica moderada permanecieron la misma cantidad de tiempo con el macho SE que el grupo control, sin quedar claro si buscaban el componente social o sexual o si simplemente no fueron capaces de distinguir entre el tipo de estimulación que recibieron (intromisión/eyaculación).

A diferencia de las hembras con hiperglucemia severa, las hembras con hiperglucemia crónica moderada no presentaron cambios en la preferencia de pareja o en la prueba de olfacción de olores sexuales, en las cuales la preferencia por el estímulo sexual es mayor que por el social, al igual que lo que ocurre con el grupo control. Nuestros datos se suman a la idea de que la hiperglucemia moderada (aunque ocurra de manera crónica) no tiene un efecto tan deletéreo como la hiperglucemia severa en algunas conductas. Así, un estudio demostró que ratas macho tratadas con STZ en la etapa neonatal no presentaban un aumento en la conducta de inmovilidad evaluada en la prueba de nado forzado (Sestile et al., 2016), datos contradictorios a los reportes que indican un aumento en la conducta de desesperanza de animales tratados con STZ en la etapa adulta y con una hiperglucemia severa (Aswar et al., 2017; Bikri et al., 2021; Hilakivi-Clarke et al., 1990). Además, reportes indican que los modelos de DM2 generan una neuropatía menos pronunciada que en los modelos de DM1 (Ferhatovic et al., 2013; Sima et al., 2000; Sima & Sugimoto, 1999).

En la clínica, también se ha observado una respuesta diferencial en algunos aspectos reproductivos. Por ejemplo, en la regularidad o la ocurrencia del ciclo menstrual, ya que un grupo de pacientes con DM1 reportaron presentar oligomenorreas, amenorreas y una disminución en la fertilidad (Salonia et al., 2006; Strotmeyer et al., 2003; Yildiz & Sandikci, 2016), mientras que en las pacientes con DM2 los cambios en el ciclo menstrual se asocian a otras

comorbilidades como el ovario poliquístico y la obesidad y no directamente con la hiperglucemia (Conn et al., 2000; Kjaer et al., 2016; Shim et al., 2011).

A nuestro conocimiento, sólo existe un estudio que realiza un análisis directo de la posible disminución del deseo sexual de pacientes con DM1 vs. DM2, ya que muchos de los que evalúan estas poblaciones, no distinguen entre el tipo de diabetes (Ali et al., 2008; Veronelli et al., 2009) o no reportan el impacto sobre el deseo (Wallner et al., 2010), y la comparación entre estudios individuales no es posible debido a el uso de distintos cuestionarios y escalas (Fatemi & Taghavi, 2009; Nowosielski et al., 2016; Ogbera et al., 2009; Omidvar et al., 2013). Sin embargo, en dicho estudio, realizado por el grupo de Doruk y cols., se reportó una disminución del 71% en la respuesta sexual (incluyendo la excitación, el deseo y la lubricación) en un grupo de mujeres con DM1 (71 participantes), mientras que el grupo con DM2 (56 participantes) presentaba un decremento del 42%, existiendo una diferencia significativa entre ambos grupos (Doruk et al., 2005), lo cual puede corresponder con lo observado en nuestro diseño experimental (mayor impacto conductual en el modelo de DM1). Desafortunadamente, aún no se ha explicado la razón de la diferencia entre ambos grupos de pacientes. Es importante mencionar que en la clínica se ha observado que en las mujeres el componente psicosocial tiene un mayor impacto en la respuesta sexual que en los hombres y que se deben considerar factores neurológicos, vasculares y hormonales que pudieran afectar la respuesta sexual (Price, 2017).

VII. Conclusiones

Los datos obtenidos en esta investigación sugieren que la hiperglucemia severa, inducida por la administración de STZ en la etapa adulta, produce una disminución en la motivación sexual sin importar si se permite o no el contacto físico con los estímulos y que dichos cambios son revertidos con la administración de insulina periférica. Además, parece existir una afectación en el procesamiento de estímulos olfativos por el bulbo olfatorio accesorio, ya que en hembras con hiperglucemia severa también se observó una disminución en la preferencia por olores sexualmente relevantes. Esta idea se encuentra apoyada por los datos obtenidos en el análisis de la activación cerebral, en el que se observa una disminución en la expresión del marcador de actividad neuronal c-Fos en varias áreas cerebrales que forman parte de la vía olfatoria accesorio. Sin embargo, la disminución en este marcador se observó en todas las estructuras cerebrales analizadas, aunque no pertenecieran a la vía olfatoria accesorio como el núcleo accumbens.

La administración de STZ en la etapa neonatal, que genera una hiperglucemia moderada en los animales adultos, sólo tuvo efectos marginales sobre la prueba de motivación sexual incentiva de las hembras ciclantes, sin afectar la preferencia por un macho sexualmente experto o por olores sexualmente relevantes, ni la motivación por la búsqueda de alimentos palatables.

VIII. Perspectivas

1. En el modelo de hiperglucemia severa explorar si la administración intracerebroventricular o en el bulbo olfatorio accesorio de insulina restaura la motivación sexual de la hembra y si este efecto se acompaña de cambios en la activación neuronal (medidos por c-Fos).
2. Realizar la evaluación conductual de las hembras con hiperglucemia moderada ampliando el tiempo entre la administración y la fecha de evaluación (de 3 meses a 6 meses), para determinar si se generan cambios a más largo plazo.
3. Ampliar el tiempo de exposición al macho estímulo para observar posibles diferencias en la expresión de c-Fos entre animales castrados y sexualmente expertos y analizar si en estas condiciones hay un efecto diferencial en hembras hiperglucémicas.
4. Comparar si existe una expresión diferencial de c-Fos en el modelo de hiperglucemia severa vs el modelo de hiperglucemia moderada.

IX. Referencias

- Ågmo, A. (1999). Sexual motivation — an inquiry into events determining the occurrence of sexual behavior. *Behavioural Brain Research*, 105(1), 129–150.
- Ågmo, A. (2003). Unconditioned Sexual Incentive Motivation in the Male Norway Rat (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology*, 117(1), 3–14. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.117.1.3>
- Ågmo, A. (2011). On the intricate relationship between sexual motivation and arousal. *Hormones and Behavior*, 59(5), 681–688. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.08.013>
- Ågmo, A. (2014). Animal models of female sexual dysfunction: Basic considerations on drugs, arousal, motivation and behavior. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 121, 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.10.003>
- Ågmo, A., Turi, A. L., Ellingsen, E., & Kaspersen, H. (2004). Preclinical models of sexual desire: Conceptual and behavioral analyses. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 78(3), 379–404. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2004.04.013>
- Ahdieh, H. B., Hamilton, J. M., & Wade, G. N. (1983). Copulatory behavior and hypothalamic estrogen and progestin receptors in chronically insulin-deficient female rats. *Physiology and Behavior*, 31(2), 219–223. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(83\)90122-1](https://doi.org/10.1016/0031-9384(83)90122-1)
- Ali, G., Subhan, F., Abbas, M., Zeb, J., Shahid, M., & Sewell, R. D. E. (2015). A streptozotocin-induced diabetic neuropathic pain model for static or dynamic mechanical allodynia and vulvodynia: validation using topical and systemic gabapentin. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 388(11), 1129–1140. <https://doi.org/10.1007/s00210-015-1145-y>
- Ali, R., Hajeri, R., Khader, Y., Shegem, N., & Ajlouni, K. (2008). Sexual dysfunction in jordanian diabetic women. *Diabetes Care*, 31(8), 1580–1581. <https://doi.org/10.2337/dc08-0081>
- American Diabetes Association. (2022, April 20). *Diabetes*.
- Arulmozhi, D. K., Veeranjaneyulu, A., & Bodhankar, S. L. (2004). Neonatal streptozotocin-induced rat model of Type 2 diabetes mellitus: A glance. *Indian Journal of Pharmacology*, 36(4), 217–221.

- Aswar, U., Chepurwar, S., Shintre, S., & Aswar, M. (2017). Telmisartan attenuates diabetes induced depression in rats. *Pharmacological Reports*, 69(2), 358–364. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2016.12.004>
- Atkinson, M. A., Eisenbarth, G. S., & Michels, A. W. (2014). Type 1 diabetes. *The Lancet*, 383(9911), 69–82. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60591-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60591-7)
- Avitsur, R., & Yirmiya, R. (1999). The partner preference paradigm: A method to study sexual motivation and performance of female rats. *Brain Research Protocols*, 3(3), 320–325. [https://doi.org/10.1016/S1385-299X\(98\)00057-9](https://doi.org/10.1016/S1385-299X(98)00057-9)
- Ayala, P., Calvo, C., Herrada, M., López, M., & Tezanos, R. (2002). Tratamiento farmacológico de la diabetes mellitus ÁMBITO FARMACÉUTICO. In *OFFARM* (Vol. 21).
- Bakker, J., Baum, M., & Slob, A. (1996). Neonatal inhibition of brain estrogen synthesis alters adult neural Fos responses to mating and pheromonal stimulation in the male rat. *Neuroscience*, 74(1), 251–260.
- Bakker, J., van Ophemert, J., Koos Slob, A., van Ophemert, J., & Slob, A. K. (1996). Sexual Differentiation of Odor and Partner Preference in the Rat. *Physiology & Behavior*, 60(2), 489–494.
- Bal, M. D., Yilmaz, S. D., Çelik, S. G., Dinçal, N., Beji, N. K., & Yalçın, Ö. (2015). Does the diabetes of type 2 affect the sexual functions of women? *Journal of Sex and Marital Therapy*, 41(1), 107–113. <https://doi.org/10.1080/0092623X.2013.842193>
- Banafshe, H. R., Hamidi, G. A., Nouredini, M., Mirhashemi, S. M., Mokhtari, R., & Shoferpour, M. (2014). Effect of curcumin on diabetic peripheral neuropathic pain: Possible involvement of opioid system. *European Journal of Pharmacology*, 723(1), 202–206. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.11.033>
- Banks, W. A., Owen, J. B., & Erickson, M. A. (2012). Insulin in the brain: There and back again. *Pharmacology and Therapeutics*, 136(1), 82–93. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.07.006>
- Bargiota, A., Dimitropoulos, K., Tzortzis, V., & Koukoulis, G. (2011). Sexual dysfunction in diabetic women. *Hormones*, 10(3), 196–206.
- Baum, M. J., & Ewritt, B. J. (1992). Increased expression of c-fos in the medial preoptic area after mating in male rats: role of afferent inputs from the medial amygdala and midbrain central tegmental field. *Neuroscience*, 50(3), 621–646.

- Beach, A. (1976). Sexual Attractivity, proceptivity, and receptivity in female mammals. *Hormones and Behavior*, *138*, 105–138.
- Becker, J. B. (2009). Sexual differentiation of motivation: A novel mechanism? *Hormones and Behavior*, *55*(5), 646–654. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.03.014>
- Becker, J. B., Rudick, C. N., & Jenkins, W. J. (2001). The Role of Dopamine in the Nucleus Accumbens and Striatum during Sexual Behavior in the Female Rat. *The Journal of Neuroscience*, *21*, 3236–3241.
- Bell, R., & Hye, R. (1983). Animal models of diabetes mellitus: physiology and pathology. *Journal of Surgical Research*, *460*. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022480483900343>
- Bennett, A. L., Gré, † B, Blasberg, M. E., Blaustein, J. D., & Blaustein, J. D. (2002). Response to Male Odours in Progesterone Receptor-and Oestrogen Receptor-Containing Cells in Female Rat Brain. *Journal of Neuroendocrinology*, *14*, 442–449. <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>
- Bequer, L., Gómez, T., Molina, J. L., Artiles, D., Bermúdez, R., & Clapés, S. (2016). Acción diabetogénica de la estreptozotocina en un modelo experimental de inducción neonatal. *Biomédica: Revista Del Instituto Nacional de Salud*, *36*(2), 2–26.
- Bergheim, D., Chu, X., & Ågmo, A. (2015). The function and meaning of female rat paracopulatory (proceptive) behaviors. *Behavioural Processes*, *118*, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2015.05.011>
- Bestetti, G., Locatelli, V., Tirone, F., Rossi, G. L., & Müller, E. E. (1985). One month of streptozotocin-diabetes induces different neuroendocrine and morphological alterations in the hypothalamo-pituitary axis of male and female rats. *Endocrinology*, *117*(1), 208–216. <https://doi.org/10.1210/endo-117-1-208>
- Bikri, S., Aboussaleh, Y., Berrani, A., Louragli, I., Hafid, A., Chakib, S., & Ahami, A. (2021). Effects of date seeds administration on anxiety and depressive symptoms in streptozotocin-induced diabetic rats: Biochemical and behavioral evidences. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, *32*(6), 1031–1040. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2020-0225>
- Blaustein, J. D. (2008). Neuroendocrine Regulation of Feminine Sexual Behavior: Lessons from Rodent Models and Thoughts About Humans. *Annual Reviews of Psychology*, *59*, 93–118. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.59.103006.093556>

- Blaustein, J. D., & Erskine, MS. (2002). Feminine Sexual Behavior: Cellular Integration of Hormonal and Afferent Information in the Rodent Forebrain. *Hormones, Brain and Behavior*, 1, 139–214. <http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=6GgHpQdk8vYC&oi=fnd&pg=PA139&dq=Feminine+sexual+behavior:+cellular+integration+of+hormonal+and+afferent+information+in+the+rodent+forebrain&ots=ObqOo0zaRk&sig=UYr9kfQocwG5asNIC33bPwuHje8>
- Both, S., ter Kuile, M., Enzlin, P., Dekkers, O., van Dijk, M., & Weijnenborg, P. (2015). Sexual Response in Women with Type 1 Diabetes Mellitus: A Controlled Laboratory Study Measuring Vaginal Blood Flow and Subjective Sexual Arousal. *Archives of Sexual Behavior*, 44(6), 1573–1587. <https://doi.org/10.1007/s10508-015-0545-x>
- Brand, T., & Slob, A. (1991). On the Organization of Partner Preference Behavior in Female Wistar Rats. In *Physiology & Behavior* (Vol. 49).
- Bressler, S. C., & Baum, M. J. (1996). Sex comparison of neural Fos immunoreactivity in the rat vomeronasal projection circuit after chemosensory stimulation. *Neuroscience*, 71(95), 1063–1072.
- Broekman, M., de Bruin, M., Smeenk, J., Slob, A. K., & van der Schoot, A. (1988). Partner Preference Behavior of Estrous Female Rats Affected by Castration of Tethered Male Incentives. *Hormones and Behavior*, 22, 324–337.
- Campbell, L. v, Redelman, M. J., Borkman, M., Mclay, J. G., & Chisholm, D. J. (1989). Factors in sexual dysfunction in diabetic female volunteer subjects. *Medical Journal of Australia* , 151.
- Carvelli, L., Moró, J. A., Kahlig, K. M., Ferrer, J. v, Sen, N., Lechleiter, J. D., Fredrik Leeb-Lundberg, L. M., Merrill, G., Lafer, E. M., Ballou, L. M., Shippenberg, T. S., Javitch, J. A., Lin, R. Z., Galli, A., & Memorial, A. L. M. (2002). PI 3-kinase regulation of dopamine uptake. *Journal of Neurochemistry*, 81, 859–869.
- Chatterjee, S., Khunti, K., & Davies, M. J. (2017). Type 2 diabetes. In *The Lancet* (Vol. 389, Issue 10085, pp. 2239–2251). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30058-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30058-2)
- Choi, G. B., Dong, H. W., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D., Swanson, L. W., & Anderson, D. J. (2005). Lhx6 delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus. *Neuron*, 46(4), 647–660. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.04.011>

- Clark, A. S., Kelton, M. C., Guarraci, F. A., & Clyons, E. Q. (2004). Hormonal status and test condition, but not sexual experience, modulate partner preference in female rats. *Hormones and Behavior*, *45*(5), 314–323. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2003.12.010>
- Clay, R. (2009, April). *What is female sexual dysfunction*.
- Conn, J. J., Jacobs, H. S., & Conway, G. S. (2000). The prevalence of polycystic ovaries in women with type 2 diabetes mellitus. *Clinical Endocrinology*, *52*(1), 81–86.
- Coolen, L. M., Peters, H. J. P. W., & Veening, J. G. (1996). Fos immunoreactivity in the rat brain following consummatory elements of sexual behavior: a sex comparison. *Brain Research*, *738*, 67–82.
- Coopersmith, C., Candurra, C., & Erskine, M. S. (1996). Effects of paced mating and intromissive stimulation on feminine sexual behavior and estrus termination in the cycling rat. *Journal of Comparative Psychology*, *110*(2), 176–186. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.110.2.176>
- Cora, M. C., Kooistra, L., & Travlos, G. (2015). Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicologic Pathology*, *0192623315570339*-. <https://doi.org/10.1177/0192623315570339>
- de Luis, D. A., & Romero, E. (2013). Análogos de insulina: Modificaciones en la estructura, consecuencias moleculares y metabólicas. *Semergen*, *39*(1), 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.semerng.2012.04.010>
- de Meyts, P. (2004). Insulin and its receptor: Structure, function and evolution. In *BioEssays* (Vol. 26, Issue 12, pp. 1351–1362). <https://doi.org/10.1002/bies.20151>
- de Olmos, H., & Lennart, J. (1978). The Afferent Connections of the Main and the Accessory Olfactory Bulb Formations in the Rat: An Experimental HRP-Study. *The Journal of Comparative Neurology*, *181*, 213–244.
- DiBenedictis, B. T., Ingraham, K. L., Baum, M. J., & Cherry, J. A. (2012). Disruption of urinary odor preference and lordosis behavior in female mice given lesions of the medial amygdala. *Physiology and Behavior*, *105*(2), 554–559. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.09.014>
- Domínguez-Salazar, E., Portillo, W., Baum, M. J., Bakker, J., & Paredes, R. G. (2002). Effect of prenatal androgen receptor antagonist or aromatase inhibitor on sexual behavior, partner preference and

neuronal Fos responses to estrous female odors in the rat accessory olfactory system. *Hormones and Behavior*.

- Doruk, H., Akbay, E., Cayan, S., Bozlu, M., & Acar, D. (2005). Effect of diabetes mellitus on female sexual function and risk factors. *Archives of Andrology*, 51(1), 1–6. <https://doi.org/10.1080/014850190512798>
- Dudley, C. A., & Moss, R. L. (1994). Lesions of the accessory olfactory bulb decrease lordotic responsiveness and reduce mating-induced c-fos expression in the accessory olfactory system. *Brain Research*, 642 (1), 29–37.
- Dudley, C. A., Rajendren, G., & Moss, R. L. (1992). Induction of FOS Immunoreactivity in Central Accessory Olfactory Structures of the Female Rat following Exposure to Conspecific Males. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 3, 360–369.
- Edwards, D. A., Pfeifle, J. K., Edwards, D. A., & And, J. K. P. (1983). Hormonal Control of Receptivity, Proceptivity and Sexual Motivation. *Physiology & Behavior*, 30, 437–443.
- Edwards, D. A., Walter, B., Liang, P., Walter, B., & LIANG Hypothalamic, P. (1996). Hypothalamic and Olfactory Control of Sexual Behavior and Partner Preference in Male Rats. In *Physiology & Behavior* (Vol. 60, Issue 5).
- Enzlin, P., Mathieu, C., van den Bruel, A., Bosteels, J., Vanderschueren, D., & Demyttenaere, K. (2002). Sexual Dysfunction in Women With Type 1 Diabetes A controlled study. *Diabetes Care*, 25(4). <http://diabetesjournals.org/care/article-pdf/25/4/672/588763/dc0402000672.pdf>
- Erol, B., Tefekli, A., Ozbey, I., Salman, F., Dincag, N., Kadioglu, A., & Tellaloglu, S. (2002). Sexual dysfunction in type II diabetic females: A comparative study. *Journal of Sex and Marital Therapy*, 28(SUPPL. 1), 55–62. <https://doi.org/10.1080/00926230252851195>
- Erskine, M. S. (1989). Solicitation behavior in the estrous female rat: A review. *Hormones and Behavior*, 23(4), 473–502. [https://doi.org/10.1016/0018-506X\(89\)90037-8](https://doi.org/10.1016/0018-506X(89)90037-8)
- Erskine, M. S. (1993). Mating-induced Increases in FOS Protein in Preoptic Area and Medial Amygdala of Cycling Female Rats. In *Brain Research Euil~i~* (Vol. 32).
- Erskine, M. S., & Hanrahan, S. B. (1997). Effects of Paced Mating on c-fos Gene Expression in the Female Rat Brain. *Journal of Neuroendocrinology*, 9, 903–912.

- Fatemi, S. S., & Taghavi, S. M. (2009). Evaluation of sexual function in women with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes and Vascular Disease Research*, 6(1), 38–39. <https://doi.org/10.3132/dvdr.2009.07>
- Ferhatovic, L., Banozic, A., Kostic, S., Kurir, T. T., Novak, A., Vrdoljak, L., Heffer, M., Sapunar, D., & Puljak, L. (2013). Expression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and pain-related behavior in rat models of type 1 and type 2 diabetes. *Anesthesia and Analgesia*, 116(3), 712–721. <https://doi.org/10.1213/ANE.0b013e318279b540>
- Ferreira-Nuño, A., Morales-Otal, A., Paredes, R. G., & Velázquez-Moctezuma, J. (2005). Sexual behavior of female rats in a multiple-partner preference test. *Hormones and Behavior*, 47(3), 290–296. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2004.11.012>
- Gao, F., & Zheng, Z. M. (2014). Animal models of diabetic neuropathic pain. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, 122(2), 100–106. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1363234>
- Gelez, H., Clement, P., Compagnie, S., Gorny, D., Laurin, M., Allers, K., Sommer, B., & Giuliano, F. (2013). Brain neuronal activation induced by flibanserin treatment in female rats. *Psychopharmacology*, 230(4), 639–652. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3194-6>
- Gentry, W., & Blaustein, J. D. (1977). Binding of estradiol by brain cell nuclei and female rat sexual behavior: inhibition by experimental diabetes. *Brain Research*, 130, 135–146.
- Georgiadis, J. R., Kringelbach, M. L., & Pfaus, J. G. (2012). Sex for fun: A synthesis of human and animal neurobiology. *Nature Reviews Urology*, 9(9), 486–498. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2012.151>
- Giddings, S. J., Orland, M. J., Weir, G. C., Bonner-Weir, S., & Permutt, M. A. (1985). Impaired insulin biosynthetic capacity in a rat model for non-insulin-dependent diabetes: Studies with dexamethasone. *Diabetes*, 34(3), 235–240.
- Gillespie, K. M. (2006). Type 1 diabetes: Pathogenesis and prevention. In *CMAJ* (Vol. 175, Issue 2, pp. 165–170). <https://doi.org/10.1503/cmaj.060244>
- Giraldi, A., & Kristensen, E. (2010). Sexual dysfunction in women with diabetes mellitus. *Journal of Sex Research*, 47(2–3), 199–211. <https://doi.org/10.1080/00224491003632834>
- Goldman, J. M., Murr, A. S., & Cooper, R. L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and Its Utility in

- Toxicological Studies. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 97, 84–97. <https://doi.org/10.1002/bdrb>
- Gómez Ayala, A. E. (2008). Terapia insulínica. *Offarm: Farmacia y Sociedad*, 27.
- Gómora, P., Beyer, C., Gonzalez-Mariscal, G., & Komisaruk, B. R. (1994). Momentary analgesia produced by copulation in female rats. *Brain Research*, 656(1), 52–58.
- Goyal, S. N., Reddy, N. M., Patil, K. R., Nakhate, K. T., Ojha, S., Patil, C. R., & Agrawal, Y. O. (2016). Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes - A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics. *Chemico-Biological Interactions*, 244, 49–63. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.11.032>
- Guarraci, F. A., Megroz, A. B., & Clark, A. S. (2004). Paced mating behavior in the female rat following lesions of three regions responsive to vaginocervical stimulation. *Brain Research*, 999(1), 40–52. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.10.056>
- Guthrie, R. A., & Guthrie, D. W. (2004). Pathophysiology of Diabetes Mellitus. *Crit Care Nurs Q*, 27(2), 113–125.
- Halpern, M., & Martínez-Marcos, A. (2003). Structure and function of the vomeronasal system: An update. *Progress in Neurobiology*, 70(3), 245–318. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(03\)00103-5](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(03)00103-5)
- Hashimoto, H., Moritani, N., Terada, M., Kromkhun, P., Fungfuang, W., Nakada, T., Yokosuka, M., & Saito, T. R. (2010). Improvement of hyperglycemia and sexual dysfunction in diabetic female rats by an artificial endocrine pancreas developed from mouse β cells. *Experimental Animals*, 59(4), 515–519. <https://doi.org/10.1538/expanim.59.515>
- Havlicek, J., Saxton, T. K., Roberts, S. C., Jozifkova, E., Lhota, S., Valentova, J., & Flegr, J. (2008). He sees, she smells? Male and female reports of sensory reliance in mate choice and non-mate choice contexts. *Personality and Individual Differences*, 45(6), 565–570. <https://doi.org/10.1016/j.paid.2008.06.019>
- Heijkoop, R., Huijgens, P. T., & Snoeren, E. M. S. (2018). Assessment of sexual behavior in rats: The potentials and pitfalls. *Behavioural Brain Research*, 352(July 2017), 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.10.029>

- Hernández-González, A. (2021). *"Interacción de posibles factores causales y áreas cerebrales involucradas en la preferencia sexual en la rata macho"*. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados. Tesis de doctorado.
- Hernández-Munive, A (2017). *Evaluación de la conducta sexual en dos modelos de hiperglucemia en la rata hembra*. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados. Tesis de maestría.
- Hernández-Munive, A., Rebolledo-Solleiro, D., & Fernández-Guasti, A. (2019). Does Chronic Hyperglycemia Affect Female Rat Sexual Behavior? Differences in Paced and Non-Paced Mating. *Journal of Sexual Medicine*, 16(8), 1130–1142. <https://doi.org/10.1016/j.jsxm.2019.05.017>
- Hernández-Munive, A., Rebolledo-Solleiro, D., & Fernández-Guasti, A. (2020). Diabetic female rats exhibit defensive aggression during mating. *Salud Mental*, 43(1), 27–33. <https://doi.org/10.17711/SM.0185-3325.2020.005>
- Hernández-Munive, A., Rebolledo-Solleiro, D., Ventura-Aquino, E., & Fernández-Guasti, A. (2018). Reduced Lordosis and Enhanced Aggression in Paced and Non-Paced Mating in Diabetic Female Rats. *Journal of Sexual Medicine*, 15(2), 124–135. <https://doi.org/10.1016/j.jsxm.2017.11.018>
- Herz, R. S., & Cahill, E. D. (1997). Differential use of sensory information in sexual behavior as a function of gender. *Human Nature*, 8(3), 275–286. <https://doi.org/10.1007/BF02912495>
- Hilakivi-Clarke, L., Wozniak, K., Durcan, M., & Linnoila, M. (1990). Behavior of Streptozotocin-Diabetic Mice in Tests of Exploration , Locomotion , Anxiety , Depression and Aggression. *Physiology & Behavior*, 48(3), 429–433.
- Holder, M. K., & Mong, J. A. (2017). The Role of Ovarian Hormones and the Medial Amygdala in Sexual Motivation. *Current Sexual Health Reports*, 9(4), 262–270. <https://doi.org/10.1007/s11930-017-0131-4>
- Homko, C. J., & Trout, K. (2006). Women and Diabetes. *Nursing Clinics of North America*, 41(4), 549–565. <https://doi.org/10.1016/j.cnur.2006.07.004>
- Hoshina, Y., Takeo, T., Nakano, K., Sato, T., & Sakuma, Y. (1994). Axon-sparing lesion of the preoptic area enhances receptivity and diminishes proceptivity among components of female rat sexual behavior. *Behavioural Brain Research*, 61, 197–204.

- Hosokawa, N., & Chiba, A. (2007). Effects of sexual experience on conspecific odor preference and male odor-induced activation of the vomeronasal projection pathway and the nucleus accumbens in female rats. *Brain Research*, 1175(1), 66–75. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.07.071>
- Hubscher, C. H., Brooks, D. L., & Johnson, J. R. (2005). A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotechnic and Histochemistry*, 80(2), 79–87. <https://doi.org/10.1080/10520290500138422>
- Inamura, K., Kashiwayanagi, M., & Kurihara, K. (1999). Regionalization of Fos immunostaining in rat accessory olfactory bulb when the vomeronasal organ was exposed to urine. *European Journal of Neuroscience*, 11(7), 2254–2260. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00646.x>
- Inamura, K., Yuko, M., Makoto, K., & Kenzo, K. (1999). Laminar distribution of pheromone-receptive neurons in rat vomeronasal epithelium. *Journal of Physiology*, 517, 731–739.
- Inhasz, A., Woodside, B., Sinzato, Y., Bernardi, M., de Grava, W., Anselmo-Franci, J., & Damasceno, D. (2013). Neonatally induced mild diabetes: influence on development, behavior and reproductive function of female Wistar rats. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 5(1), 61. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-5-61>
- International Diabetes Federation*. (2019). <https://www.idf.org/>
- Jang, M.-H., Chang, H.-K., Shin, M.-C., Lee, T.-H., Kim, Y.-P., Kim, E.-H., & Kim, C.-J. (2003). Effect of Ginseng radix on c-Fos Expression in the Hippocampus of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. In *Journal of Pharmacological Sciences J Pharmacol Sci* (Vol. 91).
- Jing, Y., Qi, C., Yuan, L., Liu, X., Gao, L., & Yin, J. (2017). Adult neural stem cell dysfunction in the subventricular zone of the lateral ventricle leads to diabetic olfactory defects. *Neural Regeneration Research*, 12(7). <https://doi.org/10.4103/1673-5374.211190>
- Karkanias, G. B., Morales, J., & Li, C. (1997). Deficits in reproductive behavior in diabetic female rats are due to hypoinsulinemia rather than hyperglycemia. *Hormones and Behavior*, 32(1), 19–29. <https://doi.org/10.1006/hbeh.1997.1401>
- Kelliher, K. R., Liu, Y. C., Baum, M. J., & Sachs, B. D. (1999). Neuronal Fos activation in olfactory bulb and forebrain of male rats having

erections in the presence of inaccessible estrous females. *Neuroscience*, 92(3), 1025–1033.

Kienast, S. G., Fadden, C., & Steger, R. W. (1993). Streptozotocin-induced diabetes blocks the positive feedback release of luteinizing hormone in the female rat. *Brain Research Bulletin*, 32(4), 399–405. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(93\)90207-R](https://doi.org/10.1016/0361-9230(93)90207-R)

Kim, N. N., Stankovic, M., Cushman, T. T., Goldstein, I., Munarriz, R., & Traish, A. M. (2006). Streptozotocin-induced diabetes in the rat is associated with changes in vaginal hemodynamics, morphology and biochemical markers. *BMC Physiology*, 6, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1472-6793-6-4>

Kjaer, K., Hagen, C. L. A. U. S., Sandø, S. H., & Eshøj, O. (2016). Epidemiology of menarche and menstrual disturbances in an Unselected Group of Women with Insulin- Dependent Compared to controls. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 75(June), 524–529. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1502479&tool=pmcentrez&rendertype=abstract%5Cnhttp://www.pnas.org/content/103/27/10456.long>

Kleinberger, J. W., & Pollin, T. I. (2015). Personalized medicine in diabetes mellitus: Current opportunities and future prospects. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1346(1), 45–56. <https://doi.org/10.1111/nyas.12757>

Kondo, Y., & Sakuma, Y. (2005). The medial amygdala controls the coital access of female rats: A possible involvement of emotional responsiveness. *Japanese Journal of Physiology*, 55(6), 345–353. <https://doi.org/10.2170/jjphysiol.RP001105>

Koprdoва, R., Osacka, J., Mach, M., & Kiss, A. (2018). Acute Impact of Selected Pyridoindole Derivatives on Fos Expression in Different Structures of the Rat Brain. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 38(1), 171–180. <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0520-2>

Kovacs, P., Morales, J. C., & Karkanias, G. B. (2003). Central insulin administration maintains reproductive behavior in diabetic female rats. *Neuroendocrinology*, 78(2), 90–95. <https://doi.org/10.1159/000071964>

Kow, L.-M., Montgomery, M. O., & Pfaff, D. W. (1979). Triggering of Lordosis Reflex in Female Rats With Somatosensory Stimulation: Quantitative Determination of Stimulus Parameters. *Journal of Neurophysiology*, 42(1). www.physiology.org/journal/jn

- le Floch, J. P., le Lievre, G., Labroue, M., Paul, M., Peynegre, R., & Perlemuter, L. (1993). Smell dysfunction and related factors in diabetic patients. *Diabetes Care*, 16(6), 934–937. <https://doi.org/10.2337/diacare.16.6.934>
- Lee, J., & Pilch, P. F. (1994). The insulin receptor: structure, function, and signaling. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 266(2), C319-C334. www.physiology.org/journal/ajpcell
- Lübke, K. T., & Pause, B. M. (2015). Always follow your nose: The functional significance of social chemosignals in human reproduction and survival. *Hormones and Behavior*, 68, 134–144. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.10.001>
- Madlafousek, J., & Hlinak, Z. (2012). Sexual Behaviour of the Female Laboratory Rat : Inventory , Patterning, and Measurement. *Behaviour*, 63(3), 129–174.
- Marcondes, F. K., Bianchi, F. J., Tanno, A. P., & Marcondes, F. K. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal. Biology*, 62(4A), 609–614.
- Martinez, L. A., & Petrusis, A. (2013). The medial preoptic area is necessary for sexual odor preference, but not sexual solicitation, in female Syrian hamsters. *Hormones and Behavior*, 63(4), 606–614. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.02.003>
- Merkonidis, C., Grosse, F., Ninh, T., Hummel, C., Haehner, A., & Hummel, T. (2015). Characteristics of chemosensory disorders—results from a survey. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 272(6), 1403–1416. <https://doi.org/10.1007/s00405-014-3210-4>
- Mezones-Holguin, E., Blümel, J. E., Huerdo, M., Vargas, R., Castro, J., Córdova, W., Valenzuela, G., & Castelo-Branco, C. (2008). Impact of diabetes mellitus on the sexuality of Peruvian postmenopausal. *Gynecological Endocrinology*, 24(8), 470–474. <https://doi.org/10.1080/09513590802273749>
- Micevych, P. E., & Meisel, R. L. (2017). Integrating neural circuits controlling female sexual behavior. In *Frontiers in Systems Neuroscience* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2017.00042>
- Mohamadi, Y., Jameie, S. B., & Akbari, M. (2015). Hyperglycemia Decreased Medial Amygdala Projections to Medial Preoptic Area in Experimental Model of Diabetes Mellitus. *Acta Medica Iranica*, 53(1), 1–7.

- Morgado, C., & Tavares, I. (2007). Diabetic neuropathy is associated to increased neuronal activity at the spinal dorsal horn: a time-course study of c-fos expression. *European Journal of Pain*, *11*(S1), S171–S172. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2007.03.402>
- Newman, A. S., & Bertelson, A. D. (1986). Sexual dysfunction in diabetic women. *Journal of Behavioral Medicine*, *9*(3), 261–270.
- Nofrey, B., Rocha, B., Lopez, H. H., & Ettenberg, A. (2008). The effects of sexual experience and estrus on male-seeking motivated behavior in the female rat. *Physiology and Behavior*, *95*(3), 533–538. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.08.002>
- Nowosielski, K., Drosdzol, A., Sipiński, A., Kowalczyk, R., & Skrzypulec, V. (2010). Diabetes mellitus and sexuality - does it really matter? *Journal of Sexual Medicine*, *7*(2 PART 1), 723–735. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2009.01561.x>
- Nowosielski, K., Wróbel, B., & Kowalczyk, R. (2016). Womens Endorsement of Models of Sexual Response: Correlates and Predictors. *Archives of Sexual Behavior*, *45*(2), 291–302. <https://doi.org/10.1007/s10508-015-0611-4>
- Ogbera, A. O., Chinenye, S., Akinlade, A., Eregie, A., & Awobusuyi, J. (2009). Frequency and correlates of sexual dysfunction in women with diabetes mellitus. *Journal of Sexual Medicine*, *6*(12), 3401–3406. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2009.01396.x>
- Ogbonnaya, E. C., Eleazu, K. C., Chukwuma, S., & Essien, U. N. (2013). Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, *12*(1), 60. <https://doi.org/10.1186/2251-6581-12-60>
- Oidor-Chan, V. H., Hong, E., Pérez-Severiano, F., Montes, S., Torres-Narváez, J. C., Valle-Mondragón, L., Pastelín-Hernández, G., & Sánchez-Mendoza, A. (2016). Fenofibrate plus Metformin Produces Cardioprotection in a Type 2 Diabetes and Acute Myocardial Infarction Model. *PPAR Research*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/8237264>
- Olucha-Bordonau, F. E., Fortes-Marco, L., Otero-García, M., Lanuza, E., & Martínez-García, F. (2015). Amygdala: Structure and Function. In *The Rat Nervous System: Fourth Edition* (pp. 441–490). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374245-2.00018-8>
- Omidvar, S., Niaki, M. T., Amiri, F. N., & Kheyrikhah, F. (2013). Sexual dysfunction among women with diabetes mellitus in a diabetic center

in Amol. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 4(2), 321–324. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.116992>

OMS. (2016). *Informe mundial sobre la diabetes*. www.who.int

Owens, W. A., Sevak, R. J., Galici, R., Chang, X., Javors, M. A., Galli, A., France, C. P., & Daws, L. C. (2005). Deficits in dopamine clearance and locomotion in hypoinsulinemic rats unmask novel modulation of dopamine transporters by amphetamine. *Journal of Neurochemistry*, 94(5), 1402–1410. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03289.x>

Paredes, R. G. (2009). Evaluating the Neurobiology of Sexual Reward. *ILAR Journal*, 50. <https://academic.oup.com/ilarjournal/article/50/1/15/745091>

Paredes, R. G., & Alonso, A. (1997). Sexual behavior regulated (paced) by the female induces conditioned place preference. *Behavioral Neuroscience*, 111(1), 123–128. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.111.1.123>

Paredes, R. G., Lopez, M. E., & Baum, M. J. (1998). Testosterone Augments Neuronal Fos Responses to Estrous Odors throughout the Vomeronasal Projection Pathway of Gonadectomized Male and Female Rats. *Hormones and Behavior*, 33, 48–57.

Paredes, R. G., & Vazquez, B. (1999). What do female rats like about sex? Paced mating. *Behavioural Brain Research*, 105(1), 117–127. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(99\)00087-X](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(99)00087-X)

Park, K., Ryu, S. B., Park, Y. il, Ahn, K., Nyeong, S., & Nam, J. H. (2001). Diabetes Mellitus Induces Vaginal Tissue Fibrosis by TGF-beta; 1 Expression in the Rat Model. *Journal of Sex & Marital Therapy*, 27(5), 577–587. <https://doi.org/10.1080/713846811>

Paxinos, G., & Watson, C. (1997). *The rat brain, in stereotaxic coordinates*. Academic Press.

Petrulis, A., Peng, M., Johnston, R. E., Petrulis, A., Peng, M., & Johnston, R. E. (1999). Effects of Vomeronasal Organ Removal on Individual Odor Discrimination, Sex-Odor Preference, and Scent Marking by Female Hamsters. In *Physiology & Behavior* (Vol. 66, Issue 1).

Pfaff, D., & Saad, F. (2020). Sexual motivation: problem solved and new problems introduced. In *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* (Vol. 41, Issue 2). De Gruyter. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2019-0055>

- Pfaus, J. G., Damsma, G., Wenkstern, D., & Fibiger, H. C. (1995). Sexual activity increases dopamine transmission in the nucleus accumbens and striatum of female rats. *Brain Research*, 693, 21–30.
- Pfaus, J. G., & Heeb, M. M. (1997). Implications of Immediate-Early Gene Induction in the Brain Following Sexual Stimulation of Female and Male Rodents. *Brain Research Bulletin*, 397–407.
- Pfaus, J. G., Kleopoulos, S. P., Mobbs, C. v, Gibbs, R. B., & Pfaff, D. W. (1993). Sexual stimulation activates c-fos within estrogen-concentrating regions of the female rat forebrain. *Brain Research*, 624, 253.
- Phillips, A., & Blaha, C. (1993). Increased extracellular dopamine in the nucleus accumbens of the rat elicited by a conditional stimulus for food: an electrochemical study'. *Physiology Pharmacology*, 71. www.nrcresearchpress.com
- Portillo, W., & Paredes, R. G. (2004). Sexual incentive motivation, olfactory preference, and activation of the vomeronasal projection pathway by sexually relevant cues in non-copulating and naive male rats. *Hormones and Behavior*, 46(3), 330–340. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2004.03.001>
- Potter, G. M., Moshirfar, A., & Castonguay, T. W. (1999). Insulin Affects Dopamine Overflow in the Nucleus Accumbens and the Striatum. *Physiology & Behavior*, 65(5), 811–816.
- Price, D. (2017). *Sexual Function in Men and Women with Diabetes*.
- Rajendren, G., & Moss, R. L. (1993). The role of the medial nucleus of amygdala in the mating-induced enhancement of lordosis in female rats: the interaction with luteinizing hormone-releasing hormone neuronal system. *Brain Research*, 617, 81–86.
- Rebolledo-Solleiro, D., & Fernández-Guasti, A. (2018). Influence of sex and estrous cycle on blood glucose levels, body weight gain, and depressive-like behavior in streptozotocin-induced diabetic rats. *Physiology and Behavior*, 194, 560–567. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.06.033>
- Rivas, F. J., & Mir, D. (1990). Effects of nucleus accumbens lesion on female rat sexual receptivity and proceptivity in a partner preference paradigm. *Behavioural Brain Research*, 239–249.
- Rivas, F. J., & Mir, D. (1991). Accumbens lesion in female rats increases mount rejection without modifying lordosis. *Revista Española de Fisiología*, 47(1), 1–6.

- Rockliffe-Fidler, C., & Kiemle, G. (2003). Sexual function in diabetic women: A psychological perspective. *Sexual and Relationship Therapy*, 18(2), 143–159. <https://doi.org/10.1080/1468199031000099415>
- Romero, P. R., Beltramino, C. A., & Carrer, H. F. (1990). Participation of the olfactory system in the control of approach behavior of the female rat to the male. *Physiology and Behavior*, 47(4), 685–690. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(90\)90078-I](https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90078-I)
- Saito, T. R., Serizawa, I., Hokao, R., Tohei, A., Aoki-komori, S., & Takahashi, K. W. (1999). Effects of Streptozotocin-induced Proceptive Behaviors Diabetes in Female on Receptive and Rats. *Experimental Animals*, 43(4), 581–584.
- Sakuma, Y. (2008). Neural substrates for sexual preference and motivation in the female and male rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1129, 55–60. <https://doi.org/10.1196/annals.1417.009>
- Salonia, A., Lanzi, R., Scavini, M., Pontillo, M., Gatti, E., Petrella, G., Licata, G., Nappi, R. E., Bosi, E., Briganti, A., Rigatti, P., & Montorsi, F. (2006). Sexual function and endocrine profile in fertile women with type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 29(2), 312–316.
- Sánchez Montoya, E. L., Hernández, L., Barreto-Estrada, J. L., Ortiz, J. G., & Jorge, J. C. (2010). The testosterone metabolite 3 α -diol enhances female rat sexual motivation when infused in the nucleus accumbens shell. *Journal of Sexual Medicine*, 7(11), 3598–3609. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2010.01937.x>
- Scalia, F., & Winans', S. (1975). The Differential Projections of the Olfactory Bulb and Accessory Olfactory Bulb in Mammals. *Journal of Comparative Neurology*, 161, 31–55.
- Secretaria de Salud. (2016). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016*. 2016. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/209093/ENSANUT.pdf>
- Serradas, P., & Dolz, M. (2007). Neonatal streptozotocin-induced diabetes mellitus: a model of insulin resistance associated with loss of adipose mass. *Metabolism*, 56(7), 977–984. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2006.05.021>
- Sestile, C. C., Maraschin, J. C., Rangel, M. P., Cuman, R. K. N., & Audi, E. A. (2016). Antidepressant-like Effect of Insulin in Streptozotocin-

- induced Type 2 Diabetes Mellitus Rats. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 119(3), 243–248. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12563>
- Sevak, R. J., Koek, W., Owens, W. A., Galli, A., Daws, L. C., & France, C. P. (2008). Feeding conditions differentially affect the neurochemical and behavioral effects of dopaminergic drugs in male rats. *European Journal of Pharmacology*, 592(1–3), 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.07.002>
- Shim, U., Oh, J.-Y., Lee, H. J., Hong, Y. S., & Sung, Y.-A. (2011). Long menstrual cycle is associated with type 2 diabetes mellitus in Korean women. *Diabetes & Metabolism Journal*, 35(4), 384–389. <https://doi.org/10.4093/dmj.2011.35.4.384>
- Siegel, L., & Wade, G. (1979). Insulin withdrawal impairs sexual receptivity and retention of brain cell nuclear estrogen receptors in diabetic rats. *Neuroendocrinology*, 29(3), 200–206.
- Sima, A. A. F., & Sugimoto, K. (1999). Experimental diabetic neuropathy: an update. *Diabetologia*, 42, 773–788.
- Sima, A. A. F., Zhang, W., Xu, G., Sugimoto, K., Guberski, D., & Yorek, M. A. (2000). A comparison of diabetic polyneuropathy in Type II diabetic BBZDR/Wor rats and in Type I diabetic BB/Wor rats. *Diabetologia*, 43, 786–793.
- Snoeren, E. M. S., Antonio-Cabrera, E., Spiteri, T., Musatov, S., Ogawa, S., Pfaff, D. W., & Ågmo, A. (2015). Role of Oestrogen α Receptors in Sociosexual Behaviour in Female Rats Housed in a Seminatural Environment. *Journal of Neuroendocrinology*, 27(11), 803–818. <https://doi.org/10.1111/jne.12321>
- Snoeren, E. M. S., Chan, J. S. W., de Jong, T. R., Waldinger, M. D., Olivier, B., & Oosting, R. S. (2011). A New Female Rat Animal Model for Hypoactive Sexual Desire Disorder; Behavioral and Pharmacological Evidence. *Journal of Sexual Medicine*, 8(1), 44–56. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2010.01998.x>
- Spiteri, T., Ogawa, S., Musatov, S., Pfaff, D. W., & Ågmo, A. (2012). The role of the estrogen receptor α in the medial preoptic area in sexual incentive motivation, proceptivity and receptivity, anxiety, and wheel running in female rats. *Behavioural Brain Research*, 230(1), 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.01.048>
- Strotmeyer, E. S., Steenkiste, A. R., Foley, T. P., Berga, S. L., & Dorman, J. S. (2003). Menstrual cycle differences between women with type 1

diabetes and women without diabetes. *Diabetes Care*, 26(4), 1016–1021. <https://doi.org/10.2337/diacare.26.4.1016>

Swanson, L. W. (2000). Interactive report Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. *Brain Research*, 886, 113–164. www.elsevier.com/locate/bres

Takahashi, A., & Miczek, K. A. (2015). Neurogenetics of aggressive behavior: Studies in rodents. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 17, 3–44. https://doi.org/10.1007/7854_2013_263

Takeo, T., Chiba, Y., & Sakuma, Y. (1993). Suppression of the Lordosis Reflex of Female Rats by Efferents of the Medial Preoptic Area. *Physiology & Behavior*, 53, 831–838.

Tan, S. Y., Mei Wong, J. L., Sim, Y. J., Wong, S. S., Mohamed Elhassan, S. A., Tan, S. H., Ling Lim, G. P., Rong Tay, N. W., Annan, N. C., Bhattamisra, S. K., & Candasamy, M. (2019). Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention. In *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews* (Vol. 13, Issue 1, pp. 364–372). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.10.008>

Taylor, G. T., Haller, J., & Regan, D. (1982). Female rats prefer an area vacated by a high testosterone male. *Physiology and Behavior*, 28(6), 953–958. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(82\)90159-7](https://doi.org/10.1016/0031-9384(82)90159-7)

Tripathi, C. D., Mehta, A. K., & Yadav, A. M. (2016). Drug combinations in diabetic neuropathic pain: An experimental validation. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 27(6), 617–624. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2015-0163>

Ventura-Aquino, E., & Paredes, R. G. (2016). Animal Models in Sexual Medicine : The Need and Importance of Studying Sexual Motivation. *Sexual Medicine Review*, 5(1), 5–19. <https://doi.org/10.1016/j.sxmr.2016.07.003>

Veronelli, A., Mauri, C., Zecchini, B., Peca, M. G., Turri, O., Valitutti, M. T., Dall’asta, C., & Pontiroli, A. E. (2009). Sexual dysfunction is frequent in premenopausal women with diabetes, obesity, and hypothyroidism, and correlates with markers of increased cardiovascular risk. A preliminary report. *Journal of Sexual Medicine*, 6(6), 1561–1568. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2009.01242.x>

Von-Campenhausen, H., & Mori, K. (2000). Convergence of segregated pheromonal pathways from the accessory olfactory bulb to the cortex

in the mouse. *Journal of Neuroscience*, 12, 33–46.
<https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00879.x>

Wakabayashi, T., Hidaka, R., Fujimaki, S., & Asashima, M. (2016). Diabetes impairs Wnt3 - induced neurogenesis in olfactory bulbs via glutamate transporter 1 inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, 291(29), 15196–15211. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.672857>

Wallner, L. P., Sarma, A. v., & Kim, C. (2010). Sexual functioning among women with and without diabetes in the Boston area community health study. *Journal of Sexual Medicine*, 7(2 PART 2), 881–887. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2009.01510.x>

Wei, J. ping, Wang, Q. hong, Zheng, H. juan, & Wei, F. (2018). Research Progress on Non-Drug Treatment for Blood Glucose Control of Type 2 Diabetes Mellitus. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 24(10), 723–727. <https://doi.org/10.1007/s11655-018-2844-2>

Weinstock, R., Wright, H., & Smith, D. (1993). Olfactory dysfunction in diabetes mellitus. *Physiology & Behavior*, 53(1), 17–21. <https://doi.org/10.1177/0003319714526971>

Wincze, J. P., Albert, A., & Bansa, S. (1993). Sexual Arousal in Diabetic Females: Physiological and Self-Report Measures. *Archives of Sexual Behavior*, 22(6), 587–601.

Wise, R. A., Newton -Kira Leeb Bryan Burnette, P., Pocock Joseph Justice Jr, D. B., Wise, R. A., Leeb -D Pocock, K., Leeb, K., Newton, P., Burnette, B., & Justice Jr, J. B. (1995). Fluctuations in nucleus accumbens dopamine concentration during intravenous cocaine self-administration in rats. *Psychopharmacology*, 120, 10–20.

Wood, R. I. (1997). Thinking about Networks in the Control of Male Hamster Sexual Behavior. *Hormones and Behavior*, 32, 40–45.

Xiao, K., Kondo, Y., & Sakuma, Y. (2004). Sex-specific effects of gonadal steroids on conspecific odor preference in the rat. *Hormones and Behavior*, 46(3), 356–361. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2004.05.008>

Xiao, K., Kondo, Y., & Sakuma, Y. (2005). Differential regulation of female rat olfactory preference and copulatory pacing by the lateral septum and medial preoptic area. *Neuroendocrinology*, 81(1), 56–62. <https://doi.org/10.1159/000084893>

Yamaguchi, T., Inamura, K., & Kashiwayanagi, M. (2000). Increases in Fos-immunoreactivity after exposure to a combination of two male urinary components in the accessory olfactory bulb of the female rat.

Brain Research, 876(1–2), 211–214. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02651-2](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02651-2)

Yang, L., & Clemens, L. G. (2000). MPOA Lesions Affect Female Pacing of Copulation in Rats. *Behavioral Neuroscience*, 114(6), 1191.

Yildiz, M., & Sandikci, M. (2016). Changes in the uterus and vagina of rats with experimentally induced diabetes and the effect of lycopene on the changes. *Romain Journal of Morphology & Embriology*, 53(3), 151–160.

Zheng, H., Li, Y.-F., Weiss, M., Mayhan, W. G., & Patel, K. P. (2002). Neuronal expression of fos protein in the forebrain of diabetic rats. In *Brain Research* (Vol. 956). www.elsevier.com/locate/brainres

Zipse, L. R., Brandling-Bennett, E. M., & Clark, A. S. (2000). Paced mating behavior in the naturally cycling and the hormone-treated female rat. *Physiology and Behavior*, 70(1–2), 205–209. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(00\)00242-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(00)00242-0)

X. Anexo

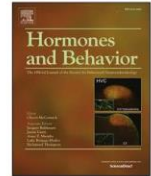
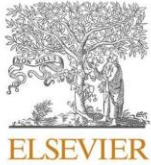
Trabajos derivados de esta tesis

Congresos

- Hernández-Munive AK; Rebolledo-Solleiro D; Fernández-Guasti JA. Reduced sexual motivation of diabetic female rat: restoration with insulin, 46 Reunión Annual del AIBIR, Boca del Río, Veracruz, 2021
- Hernández-Munive AK; Rebolledo-Solleiro D; Fernández-Guasti JA. “Insulin improves sexual motivation in diabetic female rat evaluated in two paradigms”. 49th Society for Neuroscience Annual Meeting Chicago, D.C., E.U.A. Noviembre, 2019.
- Hernández-Munive AK; Rebolledo-Solleiro D; Fernández-Guasti JA. “Sexual motivation is diminished in diabetic female rat”. III Congreso de Neurobiología, Guanajuato, Guanajuato. Septiembre, 2019

Publicaciones

- Hernández-Munive, A. K., Rebolledo-Solleiro, D., & Fernández-Guasti, A. (2021). Reduced sexual motivation of diabetic female rats: Restoration with insulin. *Hormones and Behavior*, 132, 104992. doi.org/10.1016/j.yhbeh.2021.104992
- Hernández-Munive, A., Rebolledo-Solleiro, D., & Fernández-Guasti, A., (2020). Diabetic female rats exhibit defensive aggression during mating. *Salud Mental*, 43(1), 27-33.



Reduced sexual motivation of diabetic female rats: Restoration with insulin

A.K. Hernández-Munive^a, D. Rebolledo-Solleiro^{b,c}, A. Fernández-Guasti^{a,*}

^a Departamento de Farmacobiología, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México City, Mexico

^b Laboratorio de Neurobiología Conductual, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, Mexico

^c Escuela Internacional de Medicina, Universidad Anáhuac, Cancún, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Diabetes
Sexual motivation
Female rat
Insulin
Olfaction
Streptozotocin-induced diabetes

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate female rat sexual motivation in a model of diabetes mellitus type 1. Severe hyperglycemia was induced in ovariectomized Wistar rats by injecting streptozotocin [STZ, 100 mg/kg, i.p.]. Ten days later, females received estradiol benzoate (10 µg/rat, s.c.) plus progesterone (3 mg/rat, s.c.). A group of STZ-treated animals was administered with insulin (2–4 U) every 12 h for 10 days, which normalized glucose levels. In the partner preference (PP) and sexual incentive motivation (SIM) tests, control females spent more time close to a sexually experienced male (SE) than with a castrated male (CM). STZ-treated females stayed the same amount of time with both stimuli, that is, they lost their sexual preference. We also evaluated the sense of smell using two behavioral tests, one related to sexual odors (SO) and another one to food odors (FO). In the SO test, control females spent more time sniffing the sawdust coming from cages that contained SE males; hyperglycemic females remained the same amount of time sniffing the sawdust of both stimuli: SE and CM. In the FO test, no differences were found between control and STZ-treated groups. Insulin treatment reverted the changes observed in hyperglycemic females in the PP, SIM and SO tests. These data suggest that severe hyperglycemia decreases sexual motivation and that insulin recovers such diminution.

1. Introduction

Diabetes mellitus is a syndrome characterized by chronic hyperglycemia and is currently a public health problem because is one of the most common non-transmissible diseases and is associated with several chronic complications (WHO, 2019). Among these complications are sexual dysfunctions, widely described in men and to a lesser extent in women (Bitzer and Alder, 2009). The majority of reports have studied sexual dysfunctions of women suffering of diabetes mellitus type 1 (DM1) (Esposito et al., 2010) and revealed that the most common dysfunctions are anorgasmia, dyspareunia, lack of vaginal lubrication and loss of sexual interest or desire (Doruk et al., 2005; Enzlin et al., 2003; Nowosielski et al., 2010). In this last topic there is controversy, some works report a decrease (Doruk et al., 2005; Flotyńska et al., 2019; Newman and Bertelson, 1986; Omidvar et al., 2013; Salonia et al., 2006), while others fail to find changes (Jensen, 1981; Schreiner-Engel et al., 1987; Tyrer et al., 1983; Wincze et al., 1993). This discrepancy invites a deeper study of the putative association between DM1 and sexual motivation.

In preclinical studies DM1 is commonly modeled through the administration of streptozotocin (STZ), a drug that destroys pancreatic β cells

—that produce insulin-generating hypoinsulinemia and hyperglycemia (Eleazu et al., 2013). The majority of reports studying female rat sexual behavior and STZ have focused on lordosis behavior (the consummatory component of female sexual behavior, (Beach, 1976)) induced by exogenously administered steroid hormones to ovariectomized (OVX) rats because STZ alters the estrous cycle by drastically reducing the number of spontaneous proestrus (Bestetti et al., 1985; Rebolledo-Solleiro and Fernández-Guasti, 2018). These studies agree on a decrease in lordosis (quotient and intensity) (Ahdieh et al., 1983; Gentry and Blaustein, 1977; Hashimoto et al., 2010; Hernández-Munive et al., 2018; Karkanias et al., 1997; Kovacs et al., 2003; Saito et al., 1999; Siegel and Wade, 1979), that was reverted by insulin injected either peripherally (Hashimoto et al., 2010; Karkanias et al., 1997) or centrally (Kovacs et al., 2003).

It is important to point out that the reduction in lordosis is not always accompanied by a parallel decrease in sexual motivation (Avitsur and Yirmiya, 1999; Pfeifle and Edwards, 1983). In general, attractiveness and proceptivity (other components of female sexual behavior, that consist of appetitive activities shown by females in response to stimuli received from males (Beach, 1976)) are considered to reflect sexual motivation (Ventura-Aquino and Paredes, 2016), which is defined as the

* Corresponding author.

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

<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2021.104992>

Received 21 December 2020; Received in revised form 30 March 2021; Accepted 27 April 2021

Available online 12 May 2021

0018-506X/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

physiological state that leads the animal to actively seek sexual contact with another (Drewett, 1973). Nevertheless, other reports consider preceptive behavior as a stereotype reflexive response, unrelated to sexual motivation (Cummings and Becker, 2012). Sexual motivation in all spontaneous ovulators (including rats and women) varies along the endocrine cycle, peaks around the periovulatory phase (named proestrus in rats) (Beach, 1976), and is modulated by estradiol and progesterone (Blaustein and Erskine, 2002). In animals treated with STZ controversial data have been reported regarding preceptivity (hopping, darting, and ear wiggling, (Beach, 1976)); some authors found a decrease (Karkanas et al., 1997; Saito et al., 1999), while others failed to find changes (Abdih et al., 1983; Hernández-Munive et al., 2018). However, previous works (Karkanas et al., 1997) and ourselves (unpublished data) observed that after insulin, there was an increase in the number of preceptive behaviors.

A useful paradigm to measure sexual motivation (Erskine et al., 1989; Mendelson and Gorzalka, 1987) is the paced mating (PM), where the female regulates the timing of sexual interaction (Heijkoop et al., 2018). Using this test, non-conclusive results were reported due to the low receptivity shown by hyperglycemic females that in turn reduced the vaginocervical stimulation received from the male (Hernández-Munive et al., 2018). Such important reduction precluded the calculation of the return latencies after intromission or ejaculation (lower return latencies reflect a higher motivation to continue copulating (Coopersmith et al., 1996; Erskine, 1992; Zipse et al., 2000)). Interestingly, in this test, the time that the STZ-treated females spent in the male's compartment did not differ from that of the control group. This time is also considered as an index of sexual motivation (a higher sexual motivation is inferred if the female stays a longer time in the male's compartment) (Heijkoop et al., 2018). Besides, we observed that diabetic rats exhibited increased aggression towards the male, even if they had the possibility to avoid him (Hernández-Munive et al., 2018). This behavior most likely reflects an anxious-like defensive response, rather than offensive aggression aimed to harm the male (Hernández-Munive et al., 2020).

In the present work two different and complementary paradigms were used to evaluate sexual motivation through the behaviors of approach and persistence towards a partner: the partner preference test (PPT) and the sexual incentive motivation test (SIMT) (Avitsur and Yirmiya, 1999; Hawcock et al., 2010). In both, the female can choose between a sexual or a social stimulus. The main difference between them is that in the PPT it is permitted the physical interaction between the female and the stimuli, which allows studying sexual motivation in a closer-to-natural way (Avitsur and Yirmiya, 1999; Clark et al., 2004; Hawcock et al., 2010), while, in the SIMT, physical contact is prevented allowing the female only to smell, hear and see the stimuli; in this context, the female behaviors are not influenced by physical interaction with the male (Clark et al., 2004). In these tests, females with high sexual motivation (in proestrus) spend more time close to a sexual partner (Avitsur and Yirmiya, 1999), a selection primarily established by olfactory cues (Le Moene and Agno, 2018) transmitted and integrated by the accessory olfactory system (Saito and Moltz, 1986). Classically, it is considered that the principal function of the main olfactory system is the process of volatile odors (like food odors) detected at the level of the main olfactory epithelium (Corona and Lévy, 2015), while the accessory system is involved in the detection of non-volatile odors (like pheromones) through receptors localized in the vomeronasal organ epithelium (Honda et al., 2008). It is important to point out that the processing of olfactory information between both systems is largely independent, nonetheless, there are many levels of convergence (Corona and Lévy, 2015).

On these bases, to investigate the olfactory capacity of hyperglycemic females and to analyze if the changes in sex preference were due to alterations in olfactory capacity, we conducted two behavioral tests involving sexual or food odors. Interestingly, olfactory dysfunctions can develop as a consequence of DMI in humans (Le Floch et al., 1993; Weinstock et al., 1999) or STZ treated rodents (Jing et al., 2017;

Wakabayashi et al., 2016; Rebolledo Solleiro et al., 2019). Finally, we studied whether insulin reverted the inhibitory effects of hyperglycemia on sexual motivation, as it did on lordosis (Hernández-Munive et al., 2018; Karkanas et al., 1997), preceptivity (Karkanas et al., 1997) and aggressiveness (Hernández-Munive et al., 2018).

2. Materials and methods

2.1. Subjects

For these experiments, we used one hundred and three OVX females Wistar rats (36 injected with buffer, 39 treated with STZ and 28 with STZ+ insulin) (250–300 g), and as stimuli six sexually experienced males (see below) (350–450 g) and six castrated males. All animals were kept under general laboratory conditions and were housed in groups of six per cage in a temperature-controlled room under a reversed 12:12-h light-dark cycle, starting the dark phase at 10:00 h. Food and water were available *ad libitum*. All procedures were done in accordance with the guidelines of the Laws and Codes of Mexico (Mexican Official Norm for the use and care of laboratory animals "NOM-062-ZOO-1999") following the guidelines of the National Institutes of Health for the use of animals; the Institutional Ethics Committee (CICUAL CINVESTAV) approved the protocol.

2.2. Ovariectomy

All the females utilized in this study were ovariectomized (OVX) and supplemented with hormones (see below). For the surgery, the females were anesthetized with 2,2,2-trifluoroethanol (20 mg/kg, ip). Approximately two centimeters below the lateral rib; the animal's hair was removed, and the incision areas were disinfected (skin and muscle) with benzalkonium chloride (50%). Through the incision the ovary was exposed and excised, the oviduct was ligated. The peritoneal cavity and the skin were stitched with non-absorbable sutures. The same procedure was performed on the opposite side. At least one week was allowed for recovery after surgery, before administering any treatment and the behavioral observations were made at least 17 days post ovariectomy.

2.3. STZ-treatment

Streptozotocin (STZ, Sigma Chemicals, St. Louis, MA) was diluted in citrate buffer vehicle (containing sodium citrate dehydrate and citric acid monohydrate, 0.1 M, pH 4.8) and was administered at a dose of 50 mg/kg, i.p. in two consecutive days; control animals were injected with citrate buffer, as previously described (Hernández-Munive et al., 2018). Sexual motivation- and olfaction-tests were performed ten days after the second STZ injection, which was made 8 days after OVX. Immediately after each behavioral test, blood glucose levels were measured in non-fasted rats using a glucometer and glucose strips (Accu-check Performa, Roche, Buenos Aires, Argentina). Hyperglycemia was considered when blood glucose levels were above 300 mg/dL. Body weight was registered before STZ treatment and at the end of the experiments.

2.4. Insulin treatment

The day after the last STZ administration, a sub group of female rats (STZ + INS) was injected with glargine insulin (Cronix, PISA Laboratories, Mexico) subcutaneously (2 U at 9:00 am–4 U at 9:00 pm for 6 days, and 2 U at 9:00 am–2 U at 9:00 pm in the last two days). This scheme demonstrated to be optimal in a previous study (Hernández-Munive et al., 2018). At the 10th day of treatment, the animals were submitted to behavioral evaluations (SIMT, PPT and olfaction test (OT), see below). Only females with normoglycemic values (70–120 mg/dL) were included in the analysis.

2.5. Stimulus

For the SIMT and PPT a sexually experienced male (sexual incentive) or a castrated male (social incentive) were used as stimuli. For the OT of sexually relevant cues, we used the sawdust of the bed where the stimuli were housed. A male was classified as sexually experienced (SE) when ejaculating in less than 15 min in five consecutive tests (separated by one day), as previously described (Fernández-Guasti et al., 1994). Castrated males (CA) were sexually inexperienced and had their testes and epididymis extirpated at least 15 days before the tests.

2.6. Behavioral tests

OVX females were treated with estradiol benzoate (Sigma Chemicals, St. Louis, MA, 10 µg/rat, s.c., -24 h) followed by progesterone (Sigma Chemicals, St. Louis, MA, 3 mg/rat, s.c. -4 h). This hormonal treatment was selected because in our laboratory has proved to produce optimal levels of receptivity and proceptivity (Hernández-Munive et al., 2018; Olvera-Hernández et al., 2015). Females were tested between 13:00 and 15:00 h, and efforts were taken to reproduce experimental conditions in each trial. The sexual motivation of OVX females treated with buffer, STZ or STZ + insulin was evaluated in two paradigms: PPT and SIMT.

2.7. Partner preference test (PPT)

This test was adapted from that described by Olvera-Hernández et al. (2015). The female rat was placed in a three compartments box (60 cm × 30 cm × 40 cm each) with an opening (13 × 12 cm) in both partitions near the front. In the lateral compartments were placed the stimuli (SE or CA) restrained with a harness to prevent their exit from the compartment but allowing the display of sexual behavior. The stimulus animals were adapted to the tethering device during 1 h for three consecutive days before testing. In each compartment, there was sawdust coming from the cages of the stimuli. The start middle compartment was considered neutral because there was no stimulus and contained clean sawdust. The experimental subject was able to interact with the stimuli and wander at liberty between compartments for 15 min. In this test we recorded: (a) the time of permanence in each compartment; (b) the number of mounts performed by the male; (c) the lordosis quotient ((number of lordosis / number of mounts) * 100); (d) the number of proceptive and (e) aggressive behaviors towards the stimuli.

2.8. Sexual incentive motivation test (SIMT)

The SIMT was carried out as described by Ágmo (2003). This test was performed in a rectangular box of 50 × 100 cm with two lateral compartments (30 × 20 cm) placed on opposite sides, which were connected to the chamber through a mesh allowing the female to smell, hear and see the incentive subjects (SE or CA males) without having physical interaction. In front of each compartment, a virtual incentive zone (15 × 25 cm) was delimited. The females were habituated to the box for three consecutive days in sessions of 10 min (without the stimuli), turning the box every day to avoid place preference. On the test day, the stimulus males were placed in the compartments and the experimental female in

the center of the arena and allowed to explore it for 10 min. We quantified the cumulative time that the female spent in each incentive zone. We considered a female to be in an incentive zone when all four paws had entered it.

2.9. Olfaction tests (OT)

2.9.1. Olfaction test relative to sexual odors

This test has been previously validated by Portillo and Paredes (2003). Three bowls containing sawdust of a cage housing SE or CA males, or clean sawdust were placed in the center of a rectangular box (50 × 100 cm). The female was allowed to freely explore the three bowls for 10 min; we recorded the time sniffing each of them (Portillo and Paredes, 2003).

2.9.2. Olfaction test relative to food odors

Two days before this test, the females were housed in individual boxes and once a day a small piece of chocolate (2 g) was introduced so that the females overcome neophobia. The olfaction test was carried out in the same housing box where, after removing the female, a small piece of chocolate was randomly hidden in one of the corners (modified from Edwards and Davis, 1997; Portillo and Paredes, 2004). The female was returned to the box and we evaluated the latency to find the chocolate (maximum 5 min).

All behavioral tests were videotaped for later analyses using The Observer 5.0 (Noldus®) software.

2.10. General locomotor activity

Immediately after the behavioral tests, rats were placed individually during a 5 minute session in an actimeter (45 × 45 × 20 cm, Panlab 8811-1R; Panlab, Barcelona, Spain) to register the spontaneous ambulatory activity, as described earlier (Hernández-Munive et al., 2018; Rebollo-Solleiro and Fernández-Guasti, 2018).

2.11. Statistics

The statistical analysis and the graphs were made using the Graph-Pad 8.0 software. All behavioral results are presented as the median and interquartile ranges. Weight gain and blood glucose levels are expressed in means ± SE. Most behavioral data did not follow a normal distribution (D'Agostino Pearson test) and homogeneity of variance, therefore, were compared with non-parametric tests. Paired-dependent comparisons were made with the Wilcoxon *t*-test and independent with the Mann-Whitney *U* test, while proportions were compared using the Fisher's exact test. To determine the effect size, we calculated the η^2 for nonparametric data (Fritz et al., 2012). Finally, a Kruskal-Wallis ANOVA followed by Dunn's multiple comparisons test was used to analyze differences in weight gain, blood glucose levels and behavioral data.

3. Results

Table 1 shows the gain in body weight, blood glucose levels and locomotor activity after 10 days of STZ administration and treatment

Table 1
Body weight gain, blood glucose levels and locomotor activity of buffer-, STZ- or STZ + INS-treated females.

	Weight gain (g)	Blood glucose levels (mg/dL)	Locomotor activity (number of counts)
Buffer (n = 36)	34.5 ± 2.4	121 ± 2.6	972 (841–1082)
STZ (n = 39)	3.8 ± 2.6***	524 ± 14.3***,###	752 (660–888)
STZ + INS (n = 28)	23.1 ± 4.8	86.8 ± 3.7	963 (837–1085)

Weight gain and blood glucose levels are shown as means ± SEM and locomotor activity (number of counts) as medians and interquartile ranges. Kruskal-Wallis ANOVA (see text) followed by Dunn's test for multiple comparisons: *** *p* < 0.001 vs. buffer, ### *p* < 0.001 vs. STZ + insulin.

with insulin, in OVX females supplemented with ovarian hormones. STZ-treated females gained very little weight as compared to controls and had severe hyperglycemia. After insulin restitution, these parameters did not differ from those of the control group (weight gain: Kruskal-Wallis ANOVA, $H = 11.34$, $p = 0.003$, $\eta^2 = 0.59$, blood glucose levels: $H = 26.57$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.62$). None of the treatments modified ambulatory activity.

3.1. Behavioral tests

3.1.1. Partner preference test

Fig. 1 shows the time that the OVX females (supplemented with hormones) and treated with buffer, STZ or STZ + insulin spent in the compartments containing a SE or a CA male.

As expected, control females invest more time exploring the compartment of the SE male versus that of the castrated subject ($p < 0.01$, $\eta^2 = 0.78$). This behavioral pattern was lost in the STZ-treated group, where hyperglycemic females spent a similar amount of time interacting with both stimuli (SE and CA) ($p = 0.240$, $\eta^2 = 0.14$). Insulin administration reverted the effect of STZ and the females spent more time in the compartment of the SE male ($p < 0.05$, $\eta^2 = 0.58$). In addition, females treated with STZ + INS presented an increase in the time spent in the neutral compartment compared to the control group (Kruskal-Wallis ANOVA, $H = 7.5$, $p < 0.05$, $\eta^2 = 0.20$, followed by Dunn's test) (see Table 2).

Table 2 shows the number of mounts received by the female, the lordosis quotient, the number of proceptive and aggressive events (usually in response to the interaction with the SE male), and the time spent in the neutral compartment shown by females in the partner preference test. All females received the same number of mounts; however, those treated with STZ had a decreased lordosis quotient, which was reversed by insulin administration (Kruskal-Wallis ANOVA, $H = 9.89$, $p < 0.01$, $\eta^2 = 0.40$). These data agree with those previously reported (Hernández-Munive et al., 2018). Moreover, the number of proceptive events (sum of hops, darts and ear wiggles) were not reduced in STZ-treated females, but insulin administration increased the number of proceptive behaviors (Kruskal-Wallis ANOVA, $H = 7.41$, $p < 0.05$, $\eta^2 = 0.20$). Finally, no significant differences were found in the number of aggressive behaviors (Kruskal-Wallis ANOVA, $H = 1.76$, $p = ns$, $\eta^2 = 0.35$).

3.1.2. Sexual incentive motivation test

Fig. 2 shows the cumulative time spent in the incentive zones exhibited by the females treated with buffer, STZ or STZ + INS.

Control females remained a longer time within the SE male's incentive area ($p < 0.01$, $\eta^2 = 0.56$), as compared with the CA male's adjacent zone. In contrast, the STZ-treated females spent a similar amount of time in both incentive zones ($p = 0.413$, $\eta^2 = 0.1$). Nevertheless, when the

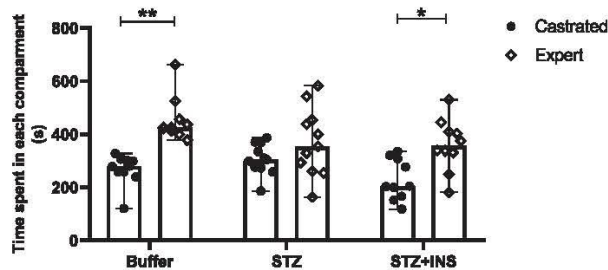


Fig. 1. Cumulative time spent by the females in the compartment containing the castrated or the sexually expert male, (buffer: $n = 10$, STZ: $n = 11$, STZ + INS: $n = 10$). Data are expressed as medians and interquartile ranges (i.q.r.). Wilcoxon t -test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. STZ: streptozotocin, STZ + INS: streptozotocin+insulin.

hyperglycemic females received chronic insulin, they displayed a similar behavioral pattern than that exhibited by the control group; an increase in the time spent in the incentive zone adjacent to the SE male ($p < 0.05$, $\eta^2 = 0.52$), revealing that insulin reverted the effect of STZ. In this test, there were no differences between the times that the females of all groups remained in the neutral zone (data not shown).

3.2. Olfaction tests

3.2.1. Olfaction test related with sexual odors

When females were given the choice between sawdust impregnated with the scent of SE or CA males, the control group spent a longer time sniffing the sawdust of SE males ($p < 0.05$, $\eta^2 = 0.58$), as compared with the sniffing time of the CA males' bedding material. In the group treated with STZ this difference disappeared ($p = 0.121$, $\eta^2 = 0.28$), i.e., they sniffed both types of sawdust for an equal amount of time. Interestingly, insulin restitution to STZ-treated females provoked an increase in the sniffing time of the sawdust coming from cages of SE males ($p < 0.05$, $\eta^2 = 0.78$) (Fig. 3), as compared to the sniffing time of the bedding material of CA males. No differences were found between the times sniffing the neutral sawdust among control and STZ + insulin groups (data not shown).

3.2.2. Olfaction test relative to food odors

Seven out of the 8 control females found the chocolate hidden in their home cage in less than 5 min, the same proportion of females treated with STZ found the chocolate (6/8) (Fisher's exact test, ns). Similarly, there was no difference in the latency to find the chocolate between both groups (median: 158 ± 40 i.q.r.: 125–180 s in controls vs. 187 i.q.r.: 165–196 s in STZ-treated, Mann-Whitney U test, $p = 0.128$, $\eta^2 = 0.80$). Because STZ lacked an effect, it was unnecessary to perform the insulin-treated group.

4. Discussion

The main findings of the present study were that hyperglycemic females had a decrease in sexual motivation in the PPT and SIMT and spent the same amount of time sniffing the sawdust coming from cages containing SE or CA males. All these changes were restored after chronic insulin. Hyperglycemia/hypoinsulinemia did not affect the ability to detect palatable food.

As aforementioned, the sexual motivation of hyperglycemic females has been scarcely studied and the data showed inconclusive results. To remind, in a previous study, using paced mating (with only a SE male as stimulus), we found that the STZ-treated females remained the same amount of time in the vicinity of the SE male as the control normoglycemic females (Hernández-Munive et al., 2018), even if their lordosis quotient was decreased. These data invited to propose that the hyperglycemic females looked for the social (including aggression), rather than the sexual component that the SE male represented. The present results of the PPT showing that hyperglycemic females did not spend more time alone in the neutral compartment, support the idea that their social capacity is unmodified. However, these females were not motivated to interact more with the SE male than with the CA one and such change was not due to motor impairments.

The idea that copulation has aversive and rewarding components for the female (Uphouse et al., 2008) should not be overlooked. As the STZ-treated females received the same amount of mounts as the control group, we propose that the aversive components may be exacerbated in this group, because hyperglycemia generates vaginal fibrosis (Kim et al., 2006; Park et al., 2001), vulvodynia (Ali et al., 2015) and neuropathy (Banafshe et al., 2014; Gao and Zheng, 2014; Tripathi et al., 2016) that may have contributed to reduce the time they spent in the area of the SE male. Also, in this paradigm, we found that the number of proceptive events was not reduced in STZ-treated females, an observation that agrees with previous reports (Ahdieh et al., 1983; Hernández-Munive

Table 2

Number of mounts received, lordosis quotient, number of proceptive and aggressive events and time in the neutral compartment of buffer-, STZ- or STZ + INS-treated females recorded in the partner preference test.

	Number of mounts received	Lordosis quotient	Number of proceptive events	Number of aggressions	Time in neutral compartment (seconds)
Buffer (n = 10)	8 (7–9)	100 (100–100)	7 (0–21)	2 (0–5)	193 (158–231)
STZ (n = 11)	6 (5–8)	60** (18.75–92.25)	4 (0–6)	2 (1–11)	241 (142–278)
STZ + INS (n = 10)	8 (7–11)	100 (73.5–100)	20+ (6–35)	2 (0–8)	329* (211–386)

Table shows median and interquartile ranges. Kruskal-Wallis ANOVA followed by Dunn's test for multiple comparisons: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. buffer, + $p < 0.05$ vs. STZ.

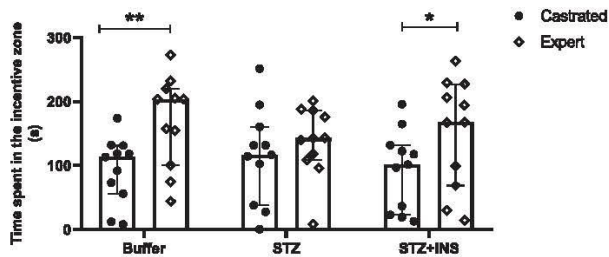


Fig. 2. Cumulative time that females spent in each incentive zone adjacent to the stimuli (buffer: n = 11, STZ: n = 11, STZ + INS: n = 11). Data are expressed as medians and interquartile ranges (i.q.r.), Wilcoxon t -test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. STZ: streptozotocin, STZ + INS: streptozotocin + insulin.

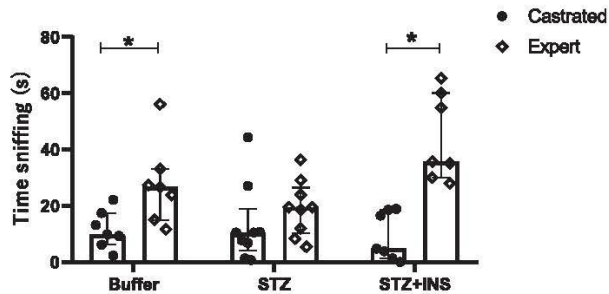


Fig. 3. Cumulative time that females spent sniffing each of the sawdusts (buffer: n = 7, STZ: n = 9, STZ + INS: n = 7). Data are expressed as medians and interquartile ranges (i.q.r.), Wilcoxon t -test, * $p < 0.05$. STZ: streptozotocin, STZ + INS: streptozotocin + insulin.

et al., 2018) and that suggest that they are sexually motivated. As aforementioned, some authors propose that proceptivity denotes sexual motivation (Beach, 1976; Rivas and Mir, 1991), however, others suggest that these behaviors are stereotyped, reflexive (they may be displayed in a non-sexual context) (Cummings and Becker, 2012), and reflect a response to the actions of the male rather than the intrinsic sexual motivation of the female (Heijkoop et al., 2018). Due to this, it is recommended to use other paradigms, such as the SIMT, where intrinsic motivation is evaluated.

In 1999, Ågmo explained that sexual motivation consists of two components: the incentive properties of the external stimuli, and the central motivated state (that refers to the integration of physiological signals and hormones -for example, with the neural substrates that will direct approach behaviors) (Ågmo, 1999). On these bases, we can raise two hypotheses to explain the lack of sexual motivation of STZ-treated females: the first implies that hyperglycemic females may not distinguish the somatosensory tracks emitted by the males, while the second assumes that the neural network or the steroid hormones fail to exert their central effect.

Three main observations support the latter: a) The dopaminergic transmission (critical for sexual incentive motivation (Georgiadis et al., 2012)) is decreased in the anterior and mediobasal hypothalamus of hyperglycemic females (Kienast et al., 1993); b) the interneuronal communication between the mesolimbic circuit (sites where estradiol acts to increase sexual motivation (Micevych and Meisel, 2017)) is decreased in animals treated with STZ (Mohamadi et al., 2015); and c) the estradiol binding to its receptor in the MPOA (a brain area closely involved in the regulation of sexual motivation (Yang and Clemens, 2000)) is already affected 24 h after insulin decrease (Ahdieh et al., 1983). In favor of this deficient central processing hypothesis, a clinical study showed that a small group of women with DM1 presented a lower physiological response to erotic stimuli, while the subjective responses (expressed in a questionnaire) were comparable to those of the control group (Wincze et al., 1993). It is important to point out that many of the results observed in preclinical studies do not fully represent what happens in the clinic, therefore the translation of the data should be carried out cautiously.

Concerning the hypothesis implying that hyperglycemic females fail to interpret the cues emitted by the male, the olfaction test for sexual stimuli showed that these females spent the same amount of time sniffing the sawdust coming from cages of SE and CA males, suggesting that the accessory olfactory bulb might be affected and could be the bases for the lack of preference in the PPT and SIMT. The alteration in olfaction seems to be specific to sexual cues because no differences were found in the latency and proportion of females able to find palatable food, suggesting a correct processing of the main olfactory bulb. In the last years, two groups reported that STZ-treated male rats exhibited impaired odor discrimination (Wakabayashi et al., 2016) and decreased olfactory sensitivity (Jing et al., 2017), as measured in a scented hole-board and in the buried food pellet tests, respectively. Although often undervalued, the sense of smell is important for human sexual life, because it processes axillary or genital odors that elicit hormonal changes and hypothalamic arousal (Lübke and Pause, 2015). Especially in women, the judgment of attractiveness and choosing a potential partner seem to depend on body odors (rather than other sensory cues) (Havlicek et al., 2008; Herz and Cahill, 1997; Lübke and Pause, 2015). Accordingly, patients with smell problems frequently state sexual and social problems (Merkonidis et al., 2015). In the clinic, it has been reported that some patients with DM1 had a decreased ability to identify odorants (Le Floch et al., 1993; Weinstock et al., 1993). Further experiments are needed to determine whether the decrease in the sexual motivation of STZ-treated females is due to a deficiency to distinguish between olfactory stimuli, to a misinterpretation of the stimuli at a central level, or to the sum of both factors.

Remarkably in the SIMT and OT relative to sexual odors, chronic insulin, in a schedule that normalized blood glucose levels, completely reverted the STZ-effect, causing that the females regained interest for the sexually relevant stimulus; while in the PPT, insulin provoked a partial effect. That is, in the PPT, insulin-treated females spent less time with the CA male at the cost of an increased time in the neutral compartment rather than with the SE male. Nowadays we ignore whether insulin reverted the effects of STZ by normalizing

hyperglycemia, hypoinsulinemia, or by its direct central action. In relation with the latter, it is known that the insulin glargine crosses the blood-brain barrier and -despite its short half-life in cerebrospinal fluid (de Luis and Romero, 2013)-, may act at its receptors in the olfactory bulb, hypothalamus, cortex and hippocampus (Banks et al., 2012). In support, it was demonstrated that (a) lordosis was restored in STZ-treated females when insulin was administered into the third ventricle, a manipulation that did not reduce hyperglycemia (Kovacs et al., 2003), and (b) the normalization of peripheral glucose levels (with the use of a restrictive diet) was insufficient to correct the decrease in lordosis and proceptivity seen in STZ-treated females (Karkanas et al., 1997). Indeed, it has been suggested that insulin plays an important role in the estrogen's signaling in the anterior hypothalamus, which is essential for the expression of sexual behavior (Kovacs et al., 2003). On these bases, we speculate that the effects of insulin here observed are also due to its central actions, and not because it corrected hyperglycemia, but future experiments are needed to support this speculation.

In closing, this study shows a diminished sexual motivation in hyperglycemic rats, which was prevented by insulin. The lack of preference in an olfaction test suggests that such decrease may be at least partly due to an olfaction impairment. Taken together, the results add information to the consequences of hyperglycemia/hypoinsulinemia on female sexual motivation and suggest an important role of insulin in modulating this pathological state.

Funding

“Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) grant 487669 (to MSc Hernández-Munive during her studies in the “Doctorado en Neurofarmacología y Terapéutica Experimental, Departamento de Farmacobiología, CINVESTAV, Sede Sur”) and grant SEP-CINVESTAV n° 19.

Declaration of competing interest

None.

Acknowledgments

The authors are indebted to Blanca Gomez-Quintanar, Msc Rebeca Reyes-Serrano, Ing. Jose Rodolfo Fernández-Calderón and Víctor Manuel Mendoza-Salas for their technical support. We are thankful with the “Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)” from the “Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)” for the grant given to Daniela Rebolledo-Solleiro (2017–2019) during her post-doctoral fellowship.

References

- Ágmo, A., 1999. Sexual motivation—an inquiry into events determining the occurrence of sexual behavior. *Behav. Brain Res.* 105, 129–150.
- Ágmo, A., 2003. Unconditioned sexual incentive motivation in the male Norway rat (*Rattus norvegicus*). *J. Comp. Psychol.* 117, 3–14. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.117.1.3>.
- Ahdieh, H.B., Hamilton, J.M., Wade, G.N., 1983. Copulatory behavior and hypothalamic estrogen and progesterin receptors in chronically insulin-deficient female rats. *Physiol. Behav.* 31, 219–223. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(83\)90122-1](https://doi.org/10.1016/0031-9384(83)90122-1).
- Ali, G., Subhan, F., Abbas, M., Zeb, J., Shahid, M., Sewell, R.D.E., 2015. A streptozotocin-induced diabetic neuropathic pain model for static or dynamic mechanical allodynia and vulvodinia: validation using topical and systemic gabapentin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 388, 1129–1140. <https://doi.org/10.1007/s00210-015-1145-y>.
- Avitsur, R., Yirmiya, R., 1999. The partner preference paradigm: a method to study sexual motivation and performance of female rats. *Brain Res. Protocol.* 3, 320–325. [https://doi.org/10.1016/S1385-299X\(98\)00057-9](https://doi.org/10.1016/S1385-299X(98)00057-9).
- Banafshe, H.R., Hamidi, G.A., Nouredini, M., Mithashemi, S.M., Mokhtari, R., Shofarpour, M., 2014. Effect of curcumin on diabetic peripheral neuropathic pain: possible involvement of opioid system. *Eur. J. Pharmacol.* 723, 202–206. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.11.033>.
- Banks, W.A., Owen, J.B., Erickson, M.A., 2012. Insulin in the brain: there and back again. *Pharmacol. Ther.* 136, 82–93. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.07.006>.
- Beach, A., 1976. Sexual attractivity, proceptivity, and receptivity in female mammals. *Horm. Behav.* 138, 105–138.
- Bestetti, G., Locatelli, V., Tirone, F., Rossi, G.L., Müller, E.E., 1985. One month of streptozotocin-diabetes induces different neuroendocrine and morphological alterations in the hypothalamic-pituitary axis of male and female rats. *Endocrinology* 117, 208–216. <https://doi.org/10.1210/endo-117-1-208>.
- Bitzer, J., Al der, J., 2009. Diabetes and female sexual health. *Women Health* 5, 629–636. <https://doi.org/10.2217/whe.09.58>.
- Blaustein, J.D., Erskine, M., 2002. Feminine sexual behavior: cellular integration of hormonal and afferent information in the rodent forebrain. *Horm. Brain Behav.* 1, 139–214.
- Clark, A.S., Kelton, M.C., Guaraci, F.A., Clyons, E.Q., 2004. Hormonal status and test condition, but not sexual experience, modulate partner preference in female rats. *Horm. Behav.* 45, 314–323. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2003.12.010>.
- Coopersmith, C., Candurra, C., Erskine, M.S., 1996. Effects of paced mating and intronissive stimulation on feminine sexual behavior and estrus termination in the cycling rat. *J. Comp. Psychol.* 110, 176–186. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.110.2.176>.
- Corona, R., Lévy, F., 2015. Chemical olfactory signals and parenthood in mammals. *Horm. Behav.* 68, 77–90. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.06.018>.
- Cummings, J.A., Becker, J.B., 2012. Quantitative assessment of female sexual motivation in the rat: hormonal control of motivation. *J. Neurosci. Methods* 204, 227–233. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.11.017>.
- de Luis, D.A., Romero, E., 2013. Análogos de insulina: Modificaciones en la estructura, consecuencias moleculares y metabólicas. *Semergen* 39, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.semerg.2012.04.010>.
- Doruk, H., Akbay, E., Çayan, S., Akbay, E., Bozlu, M., Acar, D., 2005. Effect of diabetes mellitus on female sexual function and risk factors. *Arch. Androl.* 51, 1–6. <https://doi.org/10.1080/014850190512798>.
- Drewett, R.F., 1973. Sexual behaviour and sexual motivation in the female rat. *Nature* 242, 476–477. <https://doi.org/10.1038/242476a0>.
- Edwards, D.A., Davis, A.B., 1997. Deafferentation of the olfactory bulbs of male rats reduces erection to remote cues from females. *Physiol. Behav.* 62, 145–149. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(97\)00025-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(97)00025-5).
- Eleazu, C.O., Eleazu, K.C., Chukwuma, S., Essien, U.N., 2013. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. *J. Diabetes Metab. Disord.* 12, 1–7. <https://doi.org/10.1186/2251-6581-12-60>.
- Enzin, P., Mathieu, C., Van den Bruel, A., Vanderschueren, D., Demyttenaere, K., 2003. Prevalence and predictors of sexual dysfunction in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 26, 409–414. <https://doi.org/10.2337/diacare.26.2.409>.
- Erskine, M.S., 1992. Pelvic and pudendal nerves influence the display of paced mating behavior in response to estrogen and progesterone in the female rat. *Behav. Neurosci.* 106.
- Erskine, M.S., Kornberg, E., Cherry, J.A., 1989. Paced copulation in rats: effects of intromission frequency and duration on luteal activation and estrous length. *Physiol. Behav.* 45, 33–39. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(89\)90163-7](https://doi.org/10.1016/0031-9384(89)90163-7).
- Esposito, K., Maiorino, M.I., Bellastella, G., Giugliano, E., Romano, M., Giugliano, D., 2010. Determinants of female sexual dysfunction in type 2 diabetes. *Int. J. Impot. Res.* 22, 179–184. <https://doi.org/10.1038/ijit.2010.6>.
- Fernández-Guasti, A., Omaña-Zapata, I., Luján, M., Condés-Lara, M., 1994. Actions of sciatic nerve ligation on sexual behavior of sexually experienced and inexperienced male rats: effects of frontal pole decortication. *Physiol. Behav.* 55, 577–581. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)90119-8](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90119-8).
- Flotyńska, J., Uruska, A., Michalska, A., Araszkiwicz, A., Zozulinska-Ziolkiewicz, D., 2019. Sexual dysfunction is a more common problem in young women with type 1 diabetes than in healthy women. *J. Sex Marital Ther.* 45, 643–651. <https://doi.org/10.1080/0092623X.2019.1610121>.
- Fritz, C.O., Morris, P.E., Richler, J.J., 2012. Effect size estimates: current use, calculations, and interpretation. *J. Exp. Psychol. Gen.* 141, 2–18. <https://doi.org/10.1037/a0024338>.
- Gao, F., Zheng, Z.M., 2014. Animal models of diabetic neuropathic pain. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 122, 100–106. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1363234>.
- Gentry, W., Blaustein, J.D., 1977. Diabetes mellitus was induced in the ovariectomized rats by intraperitoneal. *Brain Res.* 130, 135–146.
- Georgiadis, J.R., Kringelbach, M.L., Pfäus, J.G., 2012. Sex for fun: a synthesis of human and animal neurobiology. *Nat. Rev. Urol.* 9, 486–498. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2012.151>.
- Hashimoto, H., Moritani, N., Terada, M., Kromkhun, P., Fungfuang, W., Nakada, T., Yokosuka, M., Saito, T.R., 2010. Improvement of hyperglycemia and sexual dysfunction in diabetic female rats by an artificial endocrine pancreas developed from mouse beta cells. *Exp. Anim.* 59, 515–519. <https://doi.org/10.1538/expanim.59.515>.
- Havlicek, J., Saxton, T.K., Roberts, S.C., Zojikova, E., Lhota, S., Valentova, J., Flegl, J., 2008. He sees, she smells? Male and female reports of sensory reliance in mate choice and non-mate choice contexts. *Personal. Individ. Differ.* 45, 565–570. <https://doi.org/10.1016/j.paid.2008.06.019>.
- Hawcock, A.B., Dawkins, T.E., Reynolds, D.S., 2010. Assessment of “active investigation” as a potential measure of female sexual incentive motivation in a preclinical non-contact rodent model: observations with apomorphine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 95, 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2010.01.002>.
- Heijkoop, R., Huijgens, P.T., Snoeren, E.M.S., 2018. Assessment of sexual behavior in rats: the potentials and pitfalls. *Behav. Brain Res.* 352, 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.10.029>.
- Hernández-Munive, A.K., Rebolledo-Solleiro, D., Ventura-Aquino, E., Fernández-Guasti, A., 2018. Reduced lordosis and enhanced aggression in paced and non-paced

- mating in diabetic female rats. *J. Sex. Med.* 15, 124–135. <https://doi.org/10.1016/j.jsxm.2017.11.018>.
- Hernández-Munive, A., Rebollo-Solleiro, D., Fernández-Guasti, A., 2020. Diabetic female rats exhibit defensive aggression during mating. *Salud Ment.* 43, 27–33. <https://doi.org/10.17711/SM.0185-3325.2020.005>.
- Herz, R.S., Cahill, E.D., 1997. Differential use of sensory information in sexual behavior as a function of gender. *Hum. Nat.* 8, 275–286. <https://doi.org/10.1007/BF02912495>.
- Honda, N., Sakamoto, H., Inamura, K., Kashiwayanagi, M., 2008. Changes in Fos expression in the accessory olfactory bulb of sexually experienced male rats after exposure to female urinary pheromones. *Eur. J. Neurosci.* 27, 1980–1988. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06169.x>.
- Jensen, S.B., 1981. Diabetic sexual dysfunction: a comparative study of 160 insulin treated diabetic men and women and an age-matched control group. *Arch. Sex. Behav.* 10, 493–504. <https://doi.org/10.1007/BF01541585>.
- Jing, Y., Qi, C., Yuan, L., Liu, X., Gao, L., Yin, J., 2017. Adult neural stem cell dysfunction in the subventricular zone of the lateral ventricle leads to diabetic olfactory defects. *Neural Regen. Res.* 12 <https://doi.org/10.4103/1673-5374.211190>.
- Karkani, G.B., Morales, J., Li, C., 1997. Deficits in reproductive behavior in diabetic female rats are due to hypoinsulinemia rather than hyperglycemia. *Horm. Behav.* 32, 19–29. <https://doi.org/10.1006/hbeh.1997.1401>.
- Kienast, S.G., Fadden, C., Steger, R.W., 1993. Streptozotocin-induced diabetes blocks the positive feedback release of luteinizing hormone in the female rat. *Brain Res. Bull.* 32, 399–405. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(93\)90207-R](https://doi.org/10.1016/0361-9230(93)90207-R).
- Kim, N.N., Stankovic, M., Cushman, T.T., Goldstein, L., Munarriz, R., Traish, A.M., 2006. Streptozotocin-induced diabetes in the rat is associated with changes in vaginal hemodynamics, morphology and biochemical markers. *BMC Physiol.* 6, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1472-6793-6-4>.
- Kovacs, P., Morales, J.C., Karkani, G.B., 2003. Central insulin administration maintains reproductive behavior in diabetic female rats. *Neuroendocrinology* 78, 90–95. <https://doi.org/10.1159/000071964>.
- Le Hoch, J.P., Le Lievre, G., Labrousse, M., Paul, M., Peynre, R., Perlemuter, L., 1993. Smell dysfunction and related factors in diabetic patients. *Diabetes Care* 16, 934–937. <https://doi.org/10.2337/diacare.16.6.934>.
- Le Moëne, O., Agmo, A., 2018. The neuroendocrinology of sexual attraction. *Front. Neuroendocrinol.* 51, 46–67. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2017.12.006>.
- Lübke, K.T., Pause, B.M., 2015. Always follow your nose: the functional significance of social chemosignals in human reproduction and survival. *Horm. Behav.* 68, 134–144. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.10.001>.
- Mendelson, S.D., Gorzalka, B.B., 1987. An improved chamber for the observation and analysis of the sexual behavior of the female rat. *Physiol. Behav.* 39, 67–71. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(87\)90345-3](https://doi.org/10.1016/0031-9384(87)90345-3).
- Merkonidis, C., Grosse, F., Ninh, T., Hummel, C., Haehner, A., Hummel, T., 2015. Characteristics of chemosensory disorders—results from a survey. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 272, 1403–1416. <https://doi.org/10.1007/s00405-014-3210-4>.
- Micevych, P.E., Meisel, R.L., 2017. Integrating neural circuits controlling female sexual behavior. *Front. Syst. Neurosci.* 11, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2017.00042>.
- Mohamadi, Y., Jameie, S.B., Akbari, M., 2015. Hyperglycemia decreased medial amygdala projections to medial preoptic area in experimental model of diabetes mellitus. *Acta Med. Iran.* 53, 1–7.
- Newman, A.S., Bertelson, A.D., 1986. Sexual dysfunction in diabetic women. *J. Behav. Med.* 9, 261–270.
- Nowosiński, K., Droszdol, A., Sipiński, A., Kowalczyk, R., Skrzypulec, V., 2010. Diabetes mellitus and sexuality - does it really matter? *J. Sex. Med.* 7, 723–735. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2009.01561.x>.
- Olvera-Hernández, S., Chavira, R., Fernández-Guasti, A., 2015. Prenatal letrozole produces a subpopulation of male rats with same-sex preference and arousal as well as female sexual behavior. *Physiol. Behav.* 139, 403–411. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.11.060>.
- Omidvar, S., Niaki, M.T., Amiri, F.N., Kheyrikhah, F., 2013. Sexual dysfunction among women with diabetes mellitus in a diabetic center in Amol. *J. Nat. Sci. Biol. Med.* 4, 321–324. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.116992>.
- Park, K., Ryu, S.B., Park, Y. Il, Ahn, K., Nyeong, S., Nam, J.H., 2001. Diabetes mellitus induces vaginal tissue fibrosis by TGF-beta; 1 expression in the rat model. *J. Sex. Marital Ther.* 27, 577–587. <https://doi.org/10.1080/713846811>.
- Pfeifle, J.K., Edwards, D.A., 1983. Midbrain lesions eliminate sexual receptivity but spare sexual motivation in female rats. *Physiol. Behav.* 31, 385–389. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(83\)90206-8](https://doi.org/10.1016/0031-9384(83)90206-8).
- Portillo, W., Paredes, R.G., 2003. Sexual and olfactory preference in noncopulating male rats. *Physiol. Behav.* 80, 155–162. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(03\)00231-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(03)00231-2).
- Portillo, W., Paredes, R.G., 2004. Sexual incentive motivation, olfactory preference, and activation of the vomeronasal projection pathway by sexually relevant cues in non-copulating and naive male rats. *Horm. Behav.* 46, 330–340. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2004.03.001>.
- Rebollo-Solleiro, D., Fernández-Guasti, A., 2018. Influence of sex and estrous cycle on blood glucose levels, body weight gain, and depressive-like behavior in streptozotocin-induced diabetic rats. *Physiol. Behav.* 194, 560–567. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.06.033>.
- Rebollo-Solleiro, D., Ríos-Carrillo, J.E., Cruz-Gutiérrez, I., Espinoza-Salgado, A., Cidal Zepeda, R., Solleiro-Villavicencio, H., Roldán-Roldán, G., 2019. Reduced olfactory perception to isoamyl acetate in streptozotocin-induced diabetic female rats. In: Society for Neuroscience Annual Meeting, Chicago, IL, USA. Poster session No. 058.16.
- Rivas, F.J., Mir, D., 1991. Accumbens lesion in female rats increases mount rejection without modifying lordosis. *Rev. Esp. Fisiol.* 47, 1–6.
- Saito, T.R., Moltz, H., 1986. Sexual behavior in the female rat following removal of the vomeronasal organ. *Physiol. Behav.* 38, 81–87. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(86\)90135-6](https://doi.org/10.1016/0031-9384(86)90135-6).
- Saito, T.R., Serizawa, I., Hokao, R., Tohei, A., Aoki-komori, S., Takahashi, K.W., 1999. Effects of streptozotocin-induced diabetes on receptive and proceptive behaviors in female rats. *Exp. Anim.* 43, 581–584.
- Salonia, A., Lanzi, R., Scavini, M., Pontillo, M., Gatti, E., Petrella, G., Licata, G., Nappi, R. E., Bosi, E., Briganti, A., Rigatti, P., Montorsi, F., 2006. Sexual function and endocrine profile in fertile women with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 29, 312–316.
- Schreiner-Engel, P., Schiavi, R.C., Vettorisz, D., Smith, H., 1987. The differential impact of diabetes type on female sexuality. *J. Psychosom. Res.* 31, 23–33. [https://doi.org/10.1016/0022-3999\(87\)90094-8](https://doi.org/10.1016/0022-3999(87)90094-8).
- Siegl, L., Wade, G., 1979. Insulin withdrawal impairs sexual receptivity and retention of brain cell nuclear estrogen receptors in diabetic rats. *Neuroendocrinology* 29, 200–206.
- Tripathi, C.D., Mehta, A.K., Yadav, A.M., 2016. Drug combinations in diabetic neuropathic pain: an experimental validation. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 27, 617–624. <https://doi.org/10.1515/jbcp-2015-0163>.
- Tyrer, G., Steel, J., Ewing, D., Bancroft, J., Warner, P., Clarke, B., 1983. Sexual responsiveness in diabetic women. *Diabetologia* 24, 166–171.
- Uphouse, L., Hiegel, C., Sarkar, J., Hurlburt, J., Templeton, C., Guptarak, J., Maswood, M., 2008. Female gonadal hormones, mild restraint, and male preference. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 90, 758–762. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2008.05.026>.
- Ventura-Aquino, E., Paredes, R.G., 2016. Animal models in sexual medicine: the need and importance of studying sexual motivation. *Sex. Med. Rev.* 5, 5–19. <https://doi.org/10.1016/j.jsxm.2016.07.003>.
- Wakabayashi, T., Hidaka, R., Fujimaki, S., Asashima, M., 2016. Diabetes impairs Wnt3-induced neurogenesis in olfactory bulbs via glutamate transporter 1 inhibition. *J. Biol. Chem.* 291, 15196–15211. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.672857>.
- Weinstock, R., Wright, H., Smith, D., 1993. Olfactory dysfunction in diabetes mellitus. *Physiol. Behav.* 53, 17–21. <https://doi.org/10.1177/0003319714526971>.
- WHO, 2019. Classification of diabetes mellitus [WWW document]. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/classification-of-diabetes-mellitus>.
- Wincze, J.P., Albert, A., Bansa, S., 1993. Sexual arousal in diabetic females: physiological and self-report measures. *Arch. Sex. Behav.* 22, 587–601.
- Yang, L., Clemens, L.G., 2000. MPOA lesions affect female pacing of copulation in rats. *Behav. Neurosci.* 114, 1191.
- Zipse, L.R., Brandling-Bennett, E.M., Clark, A.S., 2000. Paced mating behavior in the naturally cycling and the hormone-treated female rat. *Physiol. Behav.* 70, 205–209. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(00\)00242-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(00)00242-0).

Diabetic female rats exhibit defensive aggression during mating

Abigail Hernández-Munive,¹ Daniela Rebolledo-Solleiro,² Alonso Fernández-Guasti¹

¹ Laboratorio de Farmacología Conductual, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

² Laboratorio de Neurobiología Conductual, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

Correspondence:

Alonso Fernández-Guasti
Laboratorio de Farmacología Conductual, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional,
Calzada de los Tenorios 235,
Col. Granjas Coapa,
Alcaldía Tlalpan,
14330, Ciudad de México, México.
Phone: +52 55 5483 - 2848
Email: jfernand@cinvestav.mx

Received: 2 August 2019

Accepted: 11 November 2019

Citation:

Hernández-Munive, A., Rebolledo-Solleiro, D., & Fernández-Guasti, A. (2019). Diabetic female rats exhibit defensive aggression during mating. *Salud Mental*, 43(1), 27-33.

DOI: 10.17711/SM.0185-3325.2020.005



ABSTRACT

Introduction. Few reports have analyzed the putative association between diabetes mellitus type 1 (DM1) and aggressiveness. A previous study using a model of DM1 reported an increase in aggressive behaviors (AB) of females against the male during mating, which was prevented by insulin. However, it was unclear if such aggression was defensive or offensive. **Objective.** To evaluate the different components of aggressiveness of hyperglycemic female rats in two distinct mating paradigms. **Method.** DM1 was modeled in OVX Wistar rats by injecting streptozotocin (STZ) diluted in citrate buffer (50 mg/kg, i.p., for 2 consecutive days). Ten days later, female rats were treated with estradiol benzoate (10 microg, -24 hours) and progesterone (3 mg, -4 hours). A group of STZ-treated animals was administered with a long-acting insulin analogue (glargine) every 12 hours for 8 days. Aggression was recorded in non-paced mating (NPM) and paced mating (PM) paradigms. We registered: the first attack latency (FAL), the proportion of females that presented AB and its type (boxing, bites, lateral kicks and twist) and if AB were exhibited defensively or offensively. **Results.** Hyperglycemic rats showed an increase in lateral kicks in NPM, whereas in PM they exhibited an increase in bites. These behaviors were always defensive and there were no changes in FAL. Insulin reduced AB. **Discussion and conclusion.** Data indicate that the aggressiveness of hyperglycemic female rats is a form of defense against the proximity of the male and add information about the role of insulin on their modulation.

Keywords: Aggression, diabetes, insulin, female, rat.

RESUMEN

Introducción. Pocos trabajos han evaluado la relación entre diabetes mellitus tipo 1 (DM1) y la agresividad. En un estudio se reportó un aumento en las conductas agresivas (CA) de las hembras contra el macho durante la cópula, las cuales se reducen administrando insulina. No está claro si estas CA se expresan de manera defensiva u ofensiva. **Objetivo.** Evaluar diferentes componentes de la agresividad de ratas hembras hiperglucémicas en dos paradigmas de cópula. **Método.** La DM1 fue modelada en ratas Wistar ovariectomizadas inyectando estreptozotocina (STZ) disuelta en buffer de citratos (50 mg/kg, i.p., durante dos días consecutivos). Diez días después, se les administró benzoato de estradiol (10 microg, -24 horas) y progesterona (3 mg, -4 horas). A un grupo tratado con STZ se le administró un análogo de insulina (glargina) cada 12 horas durante ocho días. La agresión se registró en los paradigmas de cópula no regulada (NPM) y regulada (PM). Se registraron: la latencia al primer ataque (LPA), la proporción de hembras que exhibieron alguna CA, el tipo (boxeo, mordidas, patadas laterales y giros) y si se presentaron de manera defensiva u ofensiva. **Resultados.** Las hembras diabéticas mostraron un aumento en las patadas laterales en NPM mientras que en PM exhibieron más mordidas. Las conductas fueron defensivas, no hubo cambios en la LPA. La insulina redujo la expresión de CA. **Discusión y conclusión.** Los datos indican que las CA de las hembras hiperglucémicas son una forma de defensa contra la proximidad del macho y agregan información sobre el papel de la insulina en su modulación.

Palabras clave: Agresividad, diabetes, insulina, rata, hembra.

INTRODUCTION

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disease that has been associated with a large number of comorbidities, such as neuropathies, cardiovascular diseases, and psychosocial problems, being depression the most frequent (Roy & Lloyd, 2012). It is not surprising that other behaviors could be affected by the homeostatic imbalance caused by DM, because the brain (like the rest of the body) is dependent on glucose and a failure in its control influences its functioning (Andrade, Benton, Brain, Ramirez, & Walmsley, 1988). Many patients with DM report psychiatric symptoms, such as hyperactivity, unpredictable behavior, internalizing symptoms, and solitary tendencies (van Son et al., 2013). Particularly, diabetic women experience more distress, lower self-esteem, and more depressive symptoms than men (Forsander, Bogelund, Haas, & Samuelsson, 2017; Hood et al., 2006; Lašaitė et al., 2016; Lašaitė, Ostrauskas, Zalinkevičius, Jurgevičienė, & Radzevičienė, 2015). Aggressiveness is another important concomitant symptom of DM; however, few studies have systematically analyzed their relationship. In these studies, it has been reported that there is an association between glycosylated hemoglobin and aggression (Leonard, Jang, Savik, Plumbo, & Christensen, 2002). Accordingly, patients with DM1 exhibit higher verbal aggression compared with patients suffering from other chronic diseases (Tilov, Semerzhieva, Bakova, Tomyova, & Stoyanov, 2016) or with the general population (Efe & Erdem, 2018). Nevertheless, these studies have not analyzed the data according to the sex of the patient.

Natural aggression has been considered as an adaptive behavior commonly displayed with different purposes. Firstly, it can be expressed to obtain a benefit (food, sexual partners, or territory) (Trainor, Sisk, & Nelson, 2009). Secondly, it might be exhibited as a form of defense (a response to a previous stimulation, without inflicting intentional damage) (in rats, this form of aggression is characterized by side kicks and small bites towards the flanks). Finally, it can be executed offensively, i.e., intended to cause injury to the opponent (in the rat offensive aggression consists in boxing posture or bites towards vulnerable body parts) (Adams, 1979; Umukoro, Aladeokin, & Eduviere, 2013). Notably, exaggerated levels of aggression—quantitatively characterized by short latencies to the first attack and high frequency and duration of attacks—are considered pathological (Takahashi & Miczek, 2013). The study of aggression in preclinical studies has been done primarily in males because females exhibit less aggressiveness (Cordero, Ansermet, & Sandi, 2013). These studies have been intended to determine the motivation underlying each aggressive behavior and the neurotransmitters and brain areas involved in their control.

Preclinical studies of DM (using streptozotocin [STZ], a cytotoxic of pancreatic β cells, that generates hyperglyce-

mia and hypoinsulinemia) have shown that diabetic animals also exhibit various behavioral changes as observed in humans, such as anxious- and depressive-like behaviors and a decrease in sexual behavior (Can, Ozturk, & Ozkay, 2011; ElBatsh, 2015; Sahin, Gocmez, Eraldemir, & Utkan, 2019; Várkonyi & Kempler, 2014). Few studies have evaluated the relationship between hyperglycemia and aggressiveness in animal models. They have used the intruder-resident paradigm (IRP), and their results have been controversial. Thus, the groups of Meehan (1987) and Leedom (1987) reported that male mice treated with STZ had lower aggression and investigation when placed with another male. Moreover, they presented more static defense postures and escapes (Leedom, Meehan, & Zeidler, 1987; Meehan, Leedom, Nagayama, & Zeidler, 1987). Four years later, in another work, it was reported that males administered with STZ showed a tendency to spend less time interacting socially with the resident and more time expressing aggressive behaviors (Hilakivi-Clarke, 1991).

To the best of our knowledge, in females there is only a single work reporting increased aggressiveness in STZ-treated rats tested in two distinct mating conditions (Hernandez-Munive, Rebolledo-Solleiro, Ventura-Aquino, & Fernandez-Guasti, 2018). In that study, we showed that in the non-paced mating paradigm (NPM), which implies that the timing of copulation is imposed by the male (resulting in some rejection behaviors by the females) (Hardy & DeBold, 1972), the hyperglycemic females displayed high levels of aggression, which were diminished after insulin administration (Hernandez-Munive et al., 2018). When evaluated in the paced mating paradigm (PM), where the number of aggressive behaviors in control animals is minimal because the female controls the timing of copulation by moving away from the male (Paredes & Vazquez, 1999), the aggressiveness of hyperglycemic females also tended to increase (Hernandez-Munive et al., 2018). In that report, however, we failed to analyze the features of the aggressive behaviors. Thus, the present study was aimed at establishing whether aggressiveness towards the male was offensive or defensive.

METHOD

Design of the study

Quantitative, preclinical study.

Subjects

In this study, we used 46 ovariectomized (OVX) females (250-300g) and 15 sexually experienced male Wistar rats. All animals were housed under standard conditions (22 ± 2 °C, reversed 12-hour light and 12-hour dark cy-

cle, starting the dark phase at 10:00 a.m.) and provided with food and water *ad libitum*.

Measurements

a) Behavioral test

We registered aggression in two different mating paradigms:

1. Where the male regulates sexual interaction in the non-paced mating condition (NPM). In this test, the animals were placed in a transparent circular arena (52 cm in diameter X 45 cm high). The test was carried out during the first 10 mounts (approximately 15 minutes).
2. Where the female controls the rhythm of copulation, a paradigm called “paced mating” (PM). This test was performed in a transparent acrylic box (61 cm long X 30.5 cm wide X 45 cm high) divided in two compartments. The division between compartments had two holes (4.0 cm) in each bottom corner, through which the female, but not the male rat, could freely pass from one compartment to the other. In this test, the evaluation time was longer (1h) because a greater number of mounts and intromissions are necessary to establish the pacing behavior.

To induce sexual receptivity, females were administered with estradiol benzoate (10 micrograms per rat, subcutaneously, 24 hours before the test; Sigma Chemicals, St. Louis, MA.) followed by progesterone (3 mg per rat, subcutaneously, 4 hours before the test; Sigma Chemicals, St. Louis, MA.). Animals were habituated to each paradigm for 5 minutes before introducing the sexually experienced male.

b) Aggressive behavior

For both paradigms, the latency for the first attack (time –in seconds– between the introduction of the male into the experimental arena to the first aggressive behavior), the number of aggressive females (reported as the proportion of females showing aggression), and the number of aggressive events were recorded. The behaviors considered as aggressive were the following:

- Boxing: the female stands on her two hind legs and pushes the male with the front legs.
- Bites: small bites towards the male from the front or the side, without damaging it.
- Lateral offensive posture kicking the male with hind legs.
- Twist: the female turns half of her body towards the male (Gonzalez, Vaziri, & Wilson, 1996; Madlafousek & Hliňák, 1977).

Furthermore, we determined if these behaviors were displayed offensively, –i.e., if they occurred without a prior stimulus–, or defensively, –if they were the response to a male’s approach–.

Procedures

a) STZ-Treatment

To generate hyperglycemia, OVX-females (surgery performed one week before administration) received STZ (Sigma Chemicals, St. Louis, MA) on two consecutive days (50 mg/kg/day, ip.) using citrate buffer (sodium citrate dehydrate and citric acid monohydrate .1 mol/L, pH 4.8) as vehicle. Behavioral tests were performed ten days after the last administration. At the end of the behavioral tests, plasma glucose levels were determined using a glucometer and glucose strips (Accu-Chek Performa, Roche, Buenos Aires, Argentina).

b) Insulin treatment

The insulin treatment consisted in the daily subcutaneous administration of insulin, glargine (Cronix, PiSA Laboratories, Guadalajara, Mexico) in a 12-12 h scheme. Two days after the last STZ administration, 2U of insulin were administered in the morning and 4U in the night (for 6 days). To avoid hypoglycemia, the last 2 days of treatment, the dose was lowered to 2U in the morning and 2U in the night. Only the females that at the end of the test showed blood glucose levels between 70-100 mg/dL were included.

Our data are the results of two different experimental trials, in which 5 animals of each group were evaluated. Efforts were taken to have the same experimental conditions in each trial in order to assure reproducibility.

Statistical analysis

The data were analyzed using the GraphPad 6.0 software; results are presented as the mean \pm the standard error of the mean (SEM). Glucose values and aggressiveness data were analyzed using the MannWhitney U-test because the data failed to follow a normal distribution. Proportions of females that exhibited aggressive behaviors were analyzed with the Fisher’s exact test.

Ethical considerations

All procedures were done in accordance with the guidelines of the Laws and Codes of Mexico (Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio) following the guidelines of the National Institutes of Health for the use of animals. The Institutional Ethics Committee (Cicual-CINVESTAV) approved the protocols.

RESULTS

Control animals showed normal glucose levels (103 ± 4 mg/dL) while STZ-treated animals had hyperglycemia

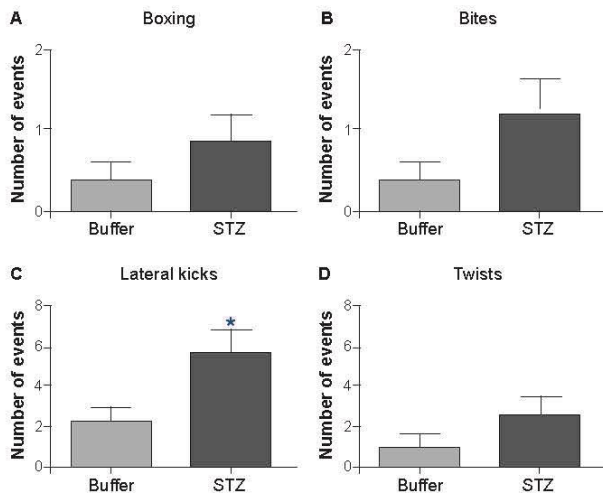


Figure 1. Aggressive behaviors: boxing (panel A), bites (panel B), lateral kicks (panel C) and twists (panel D) in NPM (Buffer $n = 10$, STZ $n = 10$). * $p < .05$ by Mann-Whitney U-test. STZ: streptozotocin.

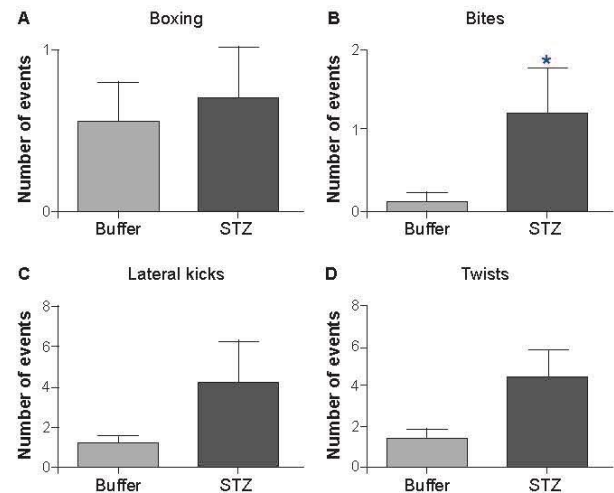


Figure 2. Aggressive behaviors: boxing (panel A), bites (panel B), lateral kicks (panel C) and twists (panel D) in PM (Buffer $n = 9$, STZ $n = 10$). * $p < .05$ by Mann-Whitney U-test. STZ: streptozotocin.

($492 \pm 19^{***}$ mg/dL [$U = 0$, $***p < .0001$]). Figure 1 shows the different aggressive behaviors (boxing posture [panel A], bites [panel B] lateral kicks [panel C] and twists [panel D]) displayed by females treated with buffer ($n = 10$) or STZ ($n = 10$) in a mating condition where they cannot regulate the timing of copulation (NPM). The control females displayed some aggressive behavior during mating; however hyperglycemic females showed more aggressions, reflected as a significant increase in the number of lateral kicks ($U = 21$, $p = .026$).

Figure 2 shows the same aggressive behaviors as those shown in figure 1, but in females tested under PM, where they regulate the time of sexual interaction. In this paradigm, the number of aggressive events was also increased in hyperglycemic females; particularly, there was a significant increase in the number of bites ($U = 22$, $p = .042$).

As shown in Table 1, all females treated with STZ presented at least one aggressive response in both paradigms; however, only in PM, where the female can escape to the neutral compartment, the proportion of females showing ag-

gression was significantly increased ($p = .02$, Fisher's exact test). Moreover, all aggressive behaviors were performed defensively, i.e., in response to a male approach. There were no significant differences in the latency to the first attack between normoglycemic and hyperglycemic females ($p = ns$). Finally, the mean number of attacks was increased in hyperglycemic females, such increase reach statistical significance only in the NPM condition and therefore only in this group insulin was administered to explore a possible blockade action.

Interestingly, insulin treatment administered to hyperglycemic females tested in NPM reduced the mean number of attacks (4 ± 2) to control values ($p = .02$, Mann-Whitney U-test) as well as the proportion of animals administered with STZ that showed aggression ($4/7$) ($p = .05$, Fisher's exact test). Furthermore, the aggressive events executed by these females were scarce, defensive and were displayed with a similar latency (92 ± 31) than those of the other groups.

Table 1

Proportion of females that presented aggressive behaviors, type of each response (defensive or offensive), latency to the first attack and the mean number of attacks presented in NPM and PM by vehicle- or STZ-treated females

	Proportion of females showing aggression		Type of response		Latency to the first attack (s)		Mean number of attacks	
	NPM	PM	NPM	PM	NPM	PM	NPM	PM
Buffer	7/10	4/9	Defensive		56 ± 29	236 ± 68	3 ± 1	3 ± 1
STZ	10/10	10/10 [^]	Defensive		52 ± 9	272 ± 106	9 ± 2*	11 ± 2

Note: NPM = non-paced mating paradigm; PM = paced mating paradigm; STZ = streptozotocin. [^] $p < .05$ vs. buffer by Fisher's exact test, * $p < .02$ vs. buffer by Mann-Whitney U-test.

DISCUSSION AND CONCLUSION

The main findings of the present study were that the STZ-treated animals exhibited aggressiveness (mostly side kicks and bites) only when the male attempted to mount the female. Remarkably, insulin treatment reverted such increased aggressive behaviors.

As aforementioned, when the female does not regulate the rhythm of sexual interaction (NPM), there is an increased aggression towards the male intended to control the pattern of stimulation that she receives (Paredes & Vazquez, 1999). In STZ-treated females, the number of these behaviors were much greater than the ones exhibited by controls. Additionally, all these responses were defensive, i.e., they were displayed as a reaction to an approach of the male. The detailed analysis of each aggressive behavior allows to infer about the underlying motivation. Adams (1979) pointed out that the lateral bites or kicks (as the ones exhibited by STZ-treated females in both mating paradigms) are deployed to a part of the body (flanks of the opponent) less vulnerable to serious damage. This observation suggests that hyperglycemic females try to reject the male without hurting him.

It is well known that the main motivation behind the enforcement of aggressive defensive behaviors is the pain or threat posed to another organism (Umukoro et al., 2013). Under this premise, we can suppose that in the case of STZ-treated females, the male represents an aversive stimulus. In support of this idea, it has been evidenced that these animals exhibit fibrosis in the vaginal tissue (Kim et al., 2006; Park et al., 2001) and neuropathy (Banafshe et al., 2014; Gao & Zheng, 2014; Tripathi, Mehta, & Yadav, 2016), which are accompanied by inflammatory reactions characterized by infiltration of macrophages and T-cells (Chakrabarty, Liao, Mu, & Smith, 2018). These factors might produce nociception in the female's rump when mounted.

Another possible explanation for the execution of aggressive defensive behaviors is that the male provokes anxious-like responses in hyperglycemic females. Accordingly, it has been reported that these females have high levels of experimental anxiety (Aksu et al., 2012), and that in postpartum females the kicks against an intruder male are anxious or fearful responses (da Veiga, Miczek, Lucion, & de Almeida, 2011). This interpretation agrees with what occurs in clinics where women with DM1 have more symptoms of internalization (anxiety, depression) (Kakleas, Kandyla, Karayianni, & Karavanaki, 2009; Naar-King et al., 2005; Tilov et al., 2016).

An interesting finding of this work is that the increased aggression produced by hyperglycemia was counteracted by insulin treatment. Naturally, peripheral insulin crosses the blood-brain barrier via a saturable transport process Kleinriders, Ferris, Cai, & Kahn, 2014) and, after prolonged

periods of hypoinsulinemia, this transport is reduced, decreasing the amount of insulin in the brain (Banks, Owen, & Erickson, 2012; Šerbedžija & Ishii, 2012). Binding of insulin to its receptor in the rodent brain is greater in areas related to cognitive and emotional functions such as: hippocampus, hypothalamus, amygdala, cortex, olfactory bulb, and septum (Craft & Stennis Watson, 2004); therefore, a decrease in insulin could interfere with the correct function of these areas. For example, it has been demonstrated that an insulin failure leads to an abnormal aminoacids metabolism, which could cause a decrease in the brain serotonin production (Korczak, Pereira, Koulajian, Matejcek, & Giacca, 2011), a neurotransmitter widely studied in the deployment of aggressiveness (Umukoro et al., 2013). In females treated with STZ, a decrease in the hypothalamic serotonin precursor (tryptophan) has been found since the first week with hyperglycemia (Chaouloff et al., 1989). In addition, it has been shown that insulin has an antidepressant-like effect in mice (Hilakivi-Clarke, 1991), probably due to the increase in serotonin levels (Gupta, Kurhe, & Radhakrishnan, 2014; Manjarrez-Gutierrez, Herrera-Marquez, Bueno-Santoyo, González-Ramírez, & Hernández, 2000), making possible to propose that insulin decreases aggressiveness by increasing the activity of this neurotransmitter system.

It is worth mentioning that our results show acute effects of hyperglycemia on the expression of aggressive behaviors. However, in the clinical setting (where the effects are chronic) there is scarce information about the association between glycemic control and aggression. Uncontrolled blood sugar in patients suffering DM1 leads to substantial psychological distress, negative moods, irritable, or aggressive behavior, and closely associated problems with relationships, self-image, and confidence (Vanstone, Rewegan, Brundisini, Dejean, & Giacomini, 2015). Accordingly, some studies have evidenced a direct relationship between poor glycemic control and a rise in aggressive behaviors (Bryden et al., 2001; Leonard et al., 2002; Zheng & Chen, 2013). Interestingly, it has been reported that for every 1 mmol/L rise in glucose levels, there is a concomitant rise of 1.7 in externalizing behavior score (McDonnell, Northam, Donath, Werther, & Cameron, 2007). Nevertheless, other authors failed to found this association (Akbaş et al., 2009). Remarkably, it has been demonstrated that intranasal administration of insulin reduces anger in healthy subjects (Benedict et al., 2004), without knowing its effects in diabetic patients. Thus, more studies are necessary to clarify the role of insulin in the modulation of aggressive behaviors.

In conclusion, the present work gives evidence that the increased aggressiveness of hyperglycemic females is a form of defense against the proximity of the male and that insulin reverts such aggression. Further studies to clarify the mechanisms underlying this association are warranted.

Funding

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) grants 420383 and 487669 (to Abigail Hernández-Munive) and grant SEP-CINVESTAV n° 109. We are thankful with Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) from the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) for the grant given to Daniela Rebolledo-Solleiro (2017-2019) during her postdoctoral fellowship.

Conflict of interest

The authors declare they have no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors are indebted to Blanca Gómez, MSc. Rebeca Reyes, Ing. José Rodolfo Fernández, and Victor Manuel Mendoza Salas for their technical support.

REFERENCES

- Adams, D. B. (1979). Brain mechanisms for offense, defense, and submission. *Behavioral and Brain Sciences*, 2(2), 201-213. doi: 10.1017/S0140525X00061926
- Akbaş, S., Karabekiroğlu, K., Özgen, T., Tasdemir, G., Karakurt, M., Şenses, A., ... Aydın, M. (2009). Association between emotional and behavioral problems and metabolic control in children and adolescents with Type 1 diabetes. *Journal of Endocrinological Investigation*, 32(4), 325-329. doi: 10.1007/BF03345721
- Aksu, I., Ates, M., Baykara, B., Kiray, M., Sisman, A. R., Buyuk, E., ... Uysal, N. (2012). Anxiety correlates to decreased blood and prefrontal cortex IGF-1 levels in streptozotocin induced diabetes. *Neuroscience Letters*, 531(2), 176-181. doi: 10.1016/j.neulet.2012.10.045
- Andrade, M. L., Benton, D., Brain, P. F., Ramirez, J. M., & Walmsley, S. V. (1988). A reexamination of the hypoglycemia aggression hypothesis in laboratory mice. *International Journal of Neuroscience*, 41(3-4), 179-186. doi: 10.3109/00207458808990724
- Banafshe, H. R., Hamidi, G. A., Nouredini, M., Mirhashemi, S. M., Mokhtari, R., & Shofepour, M. (2014). Effect of curcumin on diabetic peripheral neuropathic pain: possible involvement of opioid system. *European Journal of Pharmacology*, 723, 202-206. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.11.033
- Banks, W. A., Owen, J. B., & Erickson, M. A. (2012). Insulin in the brain: there and back again. *Pharmacology & Therapeutics*, 133(1), 82-93. doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.07.006
- Benedict, C., Hallschmid, M., Hatke, A., Schultes, B., Fehm, H. L., Born, J., & Kern, W. (2004). Intranasal insulin improves memory in humans. *Psychoneuroendocrinology*, 29(10), 1326-1334. doi: 10.1016/j.psyneuen.2004.04.003
- Bryden, K. S., Peveler, R. C., Stein, A., Neil, A., Mayou, R. A., & Dunger, D. B. (2001). Clinical and psychological course of diabetes from adolescence to young adulthood: a longitudinal cohort study. *Diabetes Care*, 24(9), 1536-1540. doi: 10.2337/diacare.24.9.1536
- Can, O. D., Ozturk, Y., & Ozkay, U. D. (2011). Effects of insulin and St. John's Wort treatments on anxiety, locomotory activity, depression, and active learning parameters of streptozotocin-diabetic rats. *Planta Medica*, 77(18), 1970-1976. doi: 10.1055/s-0031-1280129
- Cordero, M. I., Ansermet, F., & Sandi, C. (2013). Long-term programming of enhanced aggression by peripuberty stress in female rats. *Psychoneuroendocrinology*, 38(11), 2758-2769. doi: 10.1016/j.psyneuen.2013.07.005
- Craft, S., & Stennis Watson, G. S. (2004). Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific mechanisms. *The Lancet Neurology*, 3(3), 169-178. doi: 10.1016/s1474-4422(04)00681-7
- Chakraborty, A., Liao, Z., Mu, Y., & Smith, P. G. (2018). Inflammatory renin-angiotensin system disruption attenuates sensory hyperinnervation and mechanical hypersensitivity in a rat model of provoked vestibulodynia. *The Journal of Pain*, 19(3), 264-277. doi: 10.1016/j.jpain.2017.10.006
- Chaouloff, F., Laude, D., Mérimo, D., Serrurier, B., Baudrie, V., & Elghozi, J. L. (1989). Duration of streptozotocin diabetes influences the response of hypothalamic serotonin metabolism to immobilization stress. *Neuroendocrinology*, 50(3), 344-350. doi: 10.1159/000125244
- da Veiga, C. P., Miczek, K. A., Lucion, A. B., & de Almeida, R. M. (2011). Social instigation and aggression in postpartum female rats: role of 5-HT1A and 5-HT1B receptors in the dorsal raphe nucleus and prefrontal cortex. *Psychopharmacology*, 213(2-3), 475-487. doi: 10.1007/s00213-010-2083-5
- Efe, Y. S., & Erdem, E. (2018). A comparison of aggression and self-injury among type 1 diabetic and healthy adolescents: a sample from Turkey. *Archives of Psychiatric Nursing*, 32(2), 174-179. doi: 10.1016/j.apnu.2017.10.012
- ElBats, M. M. (2015). Antidepressant-like effect of simvastatin in diabetic rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 93(8), 649-656. doi: 10.1139/cjpp-2014-0560
- Forsander, G., Bogelund, M., Haas, J., & Samuelsson, U. (2017). Adolescent life with diabetes-Gender matters for level of distress. Experiences from the national TODS study. *Pediatric Diabetes*, 18(7), 651-659. doi: 10.1111/pedi.12478
- Gao, F., & Zheng, Z. M. (2014). Animal models of diabetic neuropathic pain. *Experimental Clinical Endocrinology & Diabetes*, 122(2), 100-106. doi: 10.1055/s-0033-1363234
- Gonzalez, M. I., Vaziri, S., & Wilson, C. A. (1996). Behavioral effects of α -MSH and MCH after central administration in the female rat. *Peptides*, 17(1), 171-177. doi: 10.1016/0196-9781(95)02092-6
- Gupta, D., Kurhe, Y., & Radhakrishnan, M. (2014). Antidepressant effects of insulin in streptozotocin induced diabetic mice: Modulation of brain serotonin system. *Physiology & Behavior*, 129, 73-78. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.02.036
- Hardy, D. F., & DeBold, J. F. (1972). Effects of coital stimulation upon behavior of the female rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 78(3), 400-408. doi: 10.1037/h0032536
- Hernandez-Munive, A. K., Rebolledo-Solleiro, D., Ventura-Aquino, E., & Fernandez-Guasti, A. (2018). Reduced lordosis and enhanced aggression in paced and non-paced mating in diabetic female rats. *The Journal of Sexual Medicine*, 15(2), 124-135. doi: 10.1016/j.jsxm.2017.11.018
- Hilakivi-Clarke, L. A. (1991). Effects of tryptophan on depression and aggression in STZ-D mice. *Diabetes*, 40(12), 1598-1602. doi: 10.2337/diab.40.12.1598
- Hood, K. K., Huestis, S., Maher, A., Butler, D., Volkening, L., & Laffel, L. M. (2006). Depressive symptoms in children and adolescents with type 1 diabetes: association with diabetes-specific characteristics. *Diabetes Care*, 29(6), 1389-1391. doi: 10.2337/dc06-0087
- Kakleas, K., Kandyla, B., Karayianni, C., & Karavanaki, K. (2009). Psychosocial problems in adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Diabetes & Metabolism*, 35(5), 339-350. doi: 10.1016/j.diabet.2009.05.002
- Kim, N. N., Stankovic, M., Cushman, T. T., Goldstein, I., Munarriz, R., & Traish, A. M. (2006). Streptozotocin-induced diabetes in the rat is associated with changes in vaginal hemodynamics, morphology and biochemical markers. *EMC Physiology*, 6(1), 4. doi: 10.1186/1472-6793-6-4
- Kleinridders, A., Ferris, H. A., Cai, W., & Kahn, C. R. (2014). Insulin action in brain regulates systemic metabolism and brain function. *Diabetes*, 63(7), 2232-2243. doi: 10.2337/db14-0568
- Korczak, D. J., Pereira, S., Koulajian, K., Matejcek, A., & Giacca, A. (2011). Type 1 diabetes mellitus and major depressive disorder: evidence for a biological link. *Diabetologia*, 54(10), 2483-2493. doi: 10.1007/s00125-011-2240-3
- Lašaitė, L., Dobrovolskienė, R., Danytė, E., Stankutė, I., Ražanskaitė-Virbickienė, D., Schwitzgebel, V., ... Verkauskienė, R. (2016). Diabetes distress in males and females with type 1 diabetes in adolescence and emerging adulthood. *Journal of Diabetes and its Complications*, 30(8), 1500-1505. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2016.08.013
- Lašaitė, L., Ostrauskas, R., Zalinkevicius, R., Jurgevičienė, N., & Radzevičienė, L. (2015). Profile of mood states in adult type 1 diabetes mellitus men and women with disease onset in childhood and in adulthood. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 28(3-4), 279-285. doi: 10.1515/jpem-2014-0162
- Leedom, L. J., Meehan, W. P., & Zeidler, A. (1987). Avoidance responding in mice with diabetes mellitus. *Physiology & Behavior*, 40(4), 447-451. doi:10.1016/0031-9384(87)90029-1

- Leonard, B. J., Jang, Y. P., Savik, K., Plumbo, P. M., & Christensen, R. (2002). Psychosocial factors associated with levels of metabolic control in youth with type 1 diabetes. *Journal of Pediatric Nursing, 17*(1), 28-37. doi: 10.1053/jpdn.2002.30931
- Madlafousek, J., & Hlíňák, Z. (1977). Sexual behaviour of the female laboratory rat: Inventory, patterning, and measurement. *Behaviour, 63*(3-4), 129-174. doi: 10.1163/156853977X00397
- Manjarrez-Gutierrez, G., Herrera-Marquez, R., Bueno-Santoyo, S., González-Ramírez, M., & Hernández, J. (2000). Changes in brain serotonin biosynthesis in rats with diabetes mellitus induced by streptozocin: effect of insulin treatment. *Revista de Investigación Clínica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutrición, 52*(5), 509-516.
- McDonnell, C. M., Northam, E. A., Donath, S. M., Werther, G. A., & Cameron, F. J. (2007). Hyperglycemia and externalizing behavior in children with type 1 diabetes. *Diabetes Care, 30*(9), 2211-2215. doi: 10.2337/dc07-0328
- Meehan, W. P., Leedom, L. J., Nagayama, T., & Zeidler, A. (1987). Hyperglycemia and fight-flight behavior in nondiabetic and diabetic mice. *Physiology & Behavior, 41*(5), 397-403. doi: 10.1016/0031-9384(87)90072-2
- Naar-King, S., Idalski, A., Ellis, D., Frey, M., Templin, T., Cunningham, P. B., & Cakan, N. (2005). Gender differences in adherence and metabolic control in urban youth with poorly controlled type 1 diabetes: the mediating role of mental health symptoms. *Journal of Pediatric Psychology, 31*(8), 793-802. doi: 10.1093/jpepsy/psj090
- Paredes, R. G., & Vazquez, B. (1999). What do female rats like about sex? Paced mating. *Behavioural Brain Research, 105*(1), 117-127. doi: 10.1016/S0166-4328(99)00087-X
- Park, K., Ryu, S. B., Park, Y. I., Ahn, K., Lee, S. N., & Nam, J. H. (2001). Diabetes mellitus induces vaginal tissue fibrosis by TGF-beta 1 expression in the rat model. *Journal of Sex & Marital Therapy, 27*(5), 577-587. doi: 10.1080/713846811
- Roy, T., & Lloyd, C. E. (2012). Epidemiology of depression and diabetes: A systematic review. *Journal of Affective Disorders, 142*, S8-S21. doi: 10.1016/S0165-0327(12)70004-6
- Sahin, T. D., Gocmez, S. S., Eraldemir, F. C., & Utkan, T. (2019). Anxiolytic-Like and Antidepressant-Like effects of resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. *Noro Psikiyatr Ars, 56*(2), 144-149. doi: 10.29399/npa.23176
- Šerbedžija, P., & Ishii, D. N. (2012). Insulin and insulin-like growth factor prevent brain atrophy and cognitive impairment in diabetic rats. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism, 16*(Suppl 3), S601-S610. doi: 10.4103/2230-8210.105578
- Takahashi A., Miczek K.A. (2013) Neurogenetics of Aggressive Behavior: Studies in Rodents. In: Miczek K., Meyer-Lindenberg A. (eds) Neuroscience of Aggression. *Current Topics in Behavioral Neurosciences, 17*, 3-44. Berlin, Heidelberg: Springer. doi: 10.1007/7854_2013_263
- Tilov, B., Semerdzhieva, M., Bakova, D., Tomyova, B., & Stoyanov, D. (2016). Study of the relationship between aggression and chronic diseases (diabetes and hypertension). *Journal of Evaluation in Clinical Practice, 22*(3), 421-424. doi: 10.1111/jep.12502
- Trainor, B. C., Sisk, C. L., & Nelson, R. J. (2009). Hormones and the development and expression of aggressive behavior. In *Hormones, Brain and Behavior Online, 2*, 167-205. Elsevier, Inc. doi: 10.1016/B978-008088783-8.00005-X
- Tripathi, C. D., Mehta, A. K., & Yadav, A. M. (2016). Drug combinations in diabetic neuropathic pain: an experimental validation. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology, 27*(6), 617-624. doi: 10.1515/jbcpp-2015-0163
- Umukoro, S., Aladeokin, A. C., & Eduviere, A. T. (2013). Aggressive behavior: A comprehensive review of its neurochemical mechanisms and management. *Aggression and Violent Behavior, 18*(2), 195-203. doi: 10.1016/j.avb.2012.11.002
- van Son, J., Nyklicek, I., Pop, V. J., Blonk, M. C., Erdtsieck, R. J., Spooren, P. F., ... Pouwer, F. (2013). The effects of a mindfulness-based intervention on emotional distress, quality of life, and HbA(1c) in outpatients with diabetes (DiaMind): a randomized controlled trial. *Diabetes Care, 36*(4), 823-830. doi: 10.2337/dc12-1477
- Vanstone, M., Rewegan, A., Brundisini, F., Dejean, D., & Giacomini, M. (2015). Patient perspectives on quality of life with uncontrolled type 1 diabetes mellitus: A systematic review and qualitative meta-synthesis. *Ontario Health Technology Assessment Series, 15*(17), 1-29.
- Várkonyi, T., & Kempler, P. (2014). Sexual dysfunction in diabetes. *Handbook of Clinical Neurology, 126*, 223-232. doi: 10.1016/B978-0-444-53480-4.00017-5
- Zheng, X. P., & Chen, S. H. (2013). Psycho-behavioral changes in children with type 1 diabetes mellitus. *World Journal of Pediatrics, 9*(3), 261-265. doi: 10.1007/s12519-013-0428-y