



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

CAMBIOS PLÁSTICOS EN EL CIRCUITO DE
RECOMPENSA SEXUAL, INDUCIDOS POR CONDUCTAS
MOTIVADAS EN RATAS MACHO

Tesis para obtener el título de
BIÓLOGA

PRESENTA:
ZACNITÉ MIER QUESADA

DIRECTORA
Dra. Lorena Gaytán Tocavén

CO-DIRECTOR
Dr. Raúl G. Paredes Guerrero

Abril, 2022



1. ÍNDICE

1. ÍNDICE	2
2. ABREVIATURAS	4
3. RESUMEN	6
4. SUMMARY	7
5. INTRODUCCIÓN	8
5.1. Comportamiento sexual en ratas macho	9
5.2. Comportamiento sexual en ratas hembra	11
5.3. Motivación sexual.....	12
5.4. Conductas motivadas.....	13
5.5. Sistemas dopaminérgicos como activadores de la conducta sexual...	15
5.6. Áreas cerebrales involucradas en la conducta sexual.....	19
5.6.1. Red del Comportamiento Social (SBN)	20
5.6.2. Sistema de recompensa mesolímbico (MRS).....	20
5.6.3. Sistema olfativo y bulbos olfatorios.....	22
5.6.4. Hipotálamo ventromedial (VMH).....	23
5.6.5. Amígdala	23
5.6.6. Hipocampo (HPO)	25
5.7. Plasticidad sináptica.....	26
5.8. La sinaptofisina como marcador de densidad sináptica	27
5.9. Técnicas de evaluación de actividad neuronal.....	29
6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
7. HIPÓTESIS	31
8. OBJETIVOS	31
9. MATERIAL Y MÉTODOS.....	32
9.1. Animales	32
9.2. Ovariectomía.....	32
9.3. Entrenamiento de animales estímulos	33
9.4. Pruebas de conductas motivadas	33
9.4.1. Prueba de Preferencia de Pareja (PPP)	34
9.4.2. Motivación Sexual Incentiva (MSI).....	36
9.5. Cortes histológicos	37
9.6. Inmunofluorescencia	38
9.6.1. Montaje.....	39

9.7. Microscopia confocal y obtención de imágenes	39
9.8. Estereología	44
9.9. Análisis estadístico.....	45
9.9.1. Análisis de conducta sexual en MSI y PPP	45
9.9.2. Análisis de intensidad volumétrica de SYP en PPP y MSI y grupo control..	46
9.9.3. Análisis de intensidad de SYP en los grupos PPP, MSI y control por coordenada.	46
10. RESULTADOS.....	48
10.1. Parámetros registrados en la conducta sexual	48
10.2. Intensidad de SYP.....	50
10.2.1. Intensidad volumétrica de SYP para las Prueba de Preferencia de Pareja (PPP), Motivación Sexual Incentiva (MSI) y control.....	50
10.2.2. Intensidad de SYP por coordenada para las Prueba de Preferencia de Pareja (PPP), Motivación Sexual Incentiva (MSI) y control.....	54
11. DISCUSIÓN	60
12. CONCLUSIONES	65
13. BIBLIOGRAFÍA	66

2. ABREVIATURAS

AH- Hipotálamo anterior

AMY- Amígdala

AOB- Bulbo olfatorio accesorio

BLA- Amígdala Basolateral

BNST- Núcleo de la cama de la estría terminal

BO- Bulbo olfatorio

BrdU- Bromodesoxiuridina

CPP- Preferencia de lugar condicionado

DA- Dopamina

DAT- Transportador de dopamina

DG- Giro dentado

GAP- Growth Associated Protein (Proteína asociada al crecimiento)

Glu- Glutamato

GMPc- Guanosín monofosfato cíclico

GPe- Globo pálido externo

GPi- Globo pálido interno

HPG- Eje hipotalámico-pituitario-gonadal

HPO- Hipocampo

IF- Inmunofluorescencia

IHC- Inmunohistoquímica

LE- Latencia de eyaculación

LI- Latencia de intromisión

LM- Latencia de monta

LS- Tabique Lateral

MeA- Amígdala Medial

MePD- Amígdala Medial Posterodorsal

MePV- Amígdala posteroventral

MOB- Bulbo olfatorio principal

MPOA- Área Preóptica Medial
MRI- Resonancia magnética funcional
MRS- Mesolimbic Reward System
MSI- Motivación Sexual Incentiva
NAcc- Núcleo Accumbens
NO- Óxido Nítrico
PAG- - Sustancia Gris Periacueductal del mesencéfalo
PBS- Phosphate Buffered Saline
PBT- Phosphate Buffered Saline with Tx-100
PD- Núcleo preóptico posterodorsal
PFA- Paraformaldehído
PPP- Prueba de Preferencia de Pareja
PSD- Postsynaptic Density
PVN- Núcleo Paraventricular
ROIs- Regiones de interés
SBN- Social Behavior Network
SN- Sustancia nigra
SNC- Sistema Nervioso Central
SPFp- Núcleo Talámico Subparafascicular Parvocelular
Str- Estriado
SYP- Sinaptofisina
VMH- Núcleo del hipotálamo ventromedial
VMR- Vía migratoria rostral
VNO- Órgano vomeronasal
VP- Pálido Ventral
VTA- Área Tegmental Ventral

3. RESUMEN

La plasticidad sináptica es el resultado de cambios en el número y la fuerza de las conexiones sinápticas debido al procesamiento de diferentes estímulos. Se sugiere que la experiencia sexual puede influir en la plasticidad sináptica del SNC de diversas formas, no obstante, a la fecha no hay estudios que hayan demostrado esto. En ratas macho, los mecanismos motivacionales y ejecutivos son fundamentales en la conducta sexual. Para evaluar estos mecanismos utilizamos la Prueba de Preferencia de Pareja (PPP) y la Motivación Sexual Incentiva (MSI). El objetivo del proyecto fue determinar mediante técnicas de inmunofluorescencia y estereología los cambios plásticos derivados de la activación generada por la adquisición de experiencia en las pruebas PPP y MSI en los bulbos olfatorios (OB), en el hipotálamo ventromedial (VMH), en la amígdala (AMY) y en el hipocampo (HPO), estructuras relacionadas con circuitos de recompensa sexual. Los resultados muestran que la experiencia sexual adquirida durante 10 semanas tanto en la prueba PPP como en la MSI, aumenta el tiempo que el macho pasa con la hembra, así como también hay una disminución de las latencias de monta e intromisión y un aumento del número de montas e intromisiones. De igual forma, la prueba PPP induce cambios plásticos en el giro dentado (DG) del HPO mientras que la MSI induce cambios en la AMY y en el bulbo olfatorio principal (MOB). Se puede concluir que la conducta sexual como conducta motivada, induce cambios plásticos en estructuras cerebrales pertenecientes al circuito de recompensa sexual.

4. SUMMARY

Synaptic plasticity is the result of changes in the number and strength of synaptic connections due to the processing of different stimuli. Sexual experience can influence synaptic plasticity in the CNS in many ways, to date there are no studies that have demonstrated this. In male rats, motivational and executive mechanisms are fundamental in sexual behavior. To evaluate these mechanisms we used the Partner Preference Test (PPT) and Sexual Incentive Motivation (SIM). The objective of the project was to determine the plastic changes derived from the activation generated by the acquisition of experience in the PPT and SIM tests in the olfactory bulbs (OB), the ventromedial hypothalamus (VMH), the amygdala (AMY) and the hippocampus (HPO), structures related to sexual reward circuits, by immunofluorescence techniques and stereology. The results show that the sexual experience acquired during 10 weeks in both PPT and SIM tests increases the time that the male spends with the female, as well as a decrease in mounting and intromission latencies and an increase in the number of mounts and intromissions. Similarly, the PPT test induces plastic changes in the dentate gyrus (DG) of the HPO while the MSI induces changes in the AMY and in the main olfactory bulb (MOB). We can conclude that sexual behavior as motivated behavior induces plastic changes in brain structures belonging to the sexual reward circuit.

5. INTRODUCCIÓN

El comportamiento reproductivo es crucial en todos los animales, y a pesar de su importancia para el mantenimiento y la evolución de las especies, es innecesario para la supervivencia del individuo, pues la falta de actividad sexual no pone en peligro la vida (Bedos *et al.*, 2018; Hellier *et al.*, 2019; Lenschow & Lima, 2020). Sin embargo, el comportamiento sexual permite a los mamíferos copular con el sexo opuesto, lo que promueve la fecundación y en consecuencia, el éxito reproductivo (Hellier *et al.*, 2019).

En ratas, la probabilidad de la cópula depende de la capacidad reproductiva de cada individuo (Lenschow & Lima, 2020). En general, la conducta sexual en roedores es bastante similar pudiendo observarse pequeñas diferencias entre sí. Consiste en una serie de patrones motores estereotipados realizados en una secuencia ordenada que pueden considerarse reflejos somáticos (Ågmo, 2014; Le Moëne & Ågmo, 2019; Paredes & Ågmo, 2004). La exhibición del comportamiento sexual está bajo estricto control de los esteroides sexuales gonadales, como la testosterona testicular en los machos y el estradiol y la progesterona ováricos en las hembras (Hellier *et al.*, 2019; Hull & Rodríguez-Manzo, 2009). La regulación de esta conducta se da por la interacción de las hormonas esteroideas tanto con el sistema nervioso central (SNC), como con estructuras periféricas (Hull & Rodríguez-Manzo, 2009).

En este trabajo nos centraremos en la conducta sexual de la rata por la facilidad de trabajar con estos roedores para mantenerlos en condiciones óptimas dentro del laboratorio, entre otras. Además, se conocen bien los mecanismos de modulación hormonal y las estructuras cerebrales que la controlan. Se suele dividir en dos fases: una apetitiva que corresponde a la búsqueda y aproximación hacia una pareja para lograr el contacto sexual, y otra consumatoria que consiste en ejecutar y completar la cópula como tal.

5.1. *Comportamiento sexual en ratas macho*

La conducta sexual en machos incluye el acercamiento/aproximación, considerados como patrones precopulatorios o motivacionales y el contacto que se refiere a la cópula como tal (Dorantes, 2019; Hull & Rodríguez-Manzo, 2009). Se puede dividir en tres etapas: la pre-copulatoria, la copulatoria y la post-copulatoria (Beach, 1976; Hull & Rodríguez-Manzo, 2009).

En la etapa pre-copulatoria, los machos reciben información de la proceptividad de la hembra (ver punto 5.2) (Dorantes, 2019). Además, las feromonas y los fluidos corporales del conoespecífico juegan un papel importante en el comportamiento de aproximación inicial, donde también entra en juego el sistema olfatorio principal, el sistema olfatorio accesorio y el órgano vomeronasal (VNO, por sus siglas en inglés) (Lenschow & Lima, 2020), este último también conocido como órgano de Jacobson. En conjunto, en esta etapa se reciben señales odoríferas, somatosensoriales, auditivas y visuales (Hull & Rodríguez-Manzo, 2009). En roedores, tanto hembras como machos, comenzarán un periodo de investigación anogenital mutuo y vocalizaciones de 50 kHz para estimular la actividad sexual (Geyer & Barfield, 1978; Hull & Dominguez, 2007). El macho iniciará el comportamiento mediante la aproximación para identificar el sexo y el estado reproductivo de la hembra (Beach, 1976). La intensidad de las conductas de acercamiento es un indicador de la intensidad de la motivación sexual (Ágmo, 2003).

En la etapa copulatoria ocurre la monta. Así como en las hembras la postura fundamental en el comportamiento sexual es la lordosis (véase punto 5.2), la monta lo es en los machos. El macho se coloca atrás haciendo contacto físico con la espalda de la hembra y ejecuta movimientos pélvicos anteroposteriores estereotipados sin introducción del pene (Paredes & Ágmo, 2004). Al igual que la lordosis en hembras, los movimientos pélvicos del macho también pueden ser considerados como reflejos somáticos (Paredes & Ágmo, 2004). Si una monta con empuje pélvico se asocia con la erección del pene y la actividad apropiada de los músculos estriados del pene, puede resultar una intromisión (penetración vaginal) (Paredes & Ágmo, 2004), para lo cual, las hembras responden desplegando, la lordosis (Snoeren *et al.*, 2014).

En la rata, el macho realiza de 5 a 10 intromisiones en la hembra antes de eyacular (Hull & Rodríguez-Manzo, 2009; Paredes & Ågmo, 2004). Otros autores (Snoeren *et al.*, 2014) establecen que se necesitan de 10 a 20 intromisiones durante un período corto, alrededor de 2 a 10 minutos, para eyacular. Cada intromisión proporciona estimulación sensorial que, al acumularse, activará el reflejo autónomo de emisión seminal y el reflejo somático de eyaculación (Paredes & Ågmo, 2004). Después de varias intromisiones es probable que ocurra la eyaculación, acto copulatorio consistente en una intromisión con expulsión de semen. La eyaculación consta de dos elementos: las emisiones, secreción y movimiento de los fluidos seminales hacia la uretra, y la expulsión energética del contenido uretral (Snoeren *et al.*, 2014).

La tercera etapa es la fase post-eyaculatoria. Estos movimientos pélvicos energéticos terminan cuando el macho da un salto hacia atrás, seguido por el acicalamiento genital y entra en un periodo de reposo llamado intervalo post-eyaculatorio. Este es un periodo de inactividad sexual que, en ratas, puede durar de 5 a 10 minutos aproximadamente (Dorantes, 2019) antes de que comience otra serie copulatoria. Durante este tiempo, denominado periodo refractario absoluto, ningún tipo de estímulos puede inducir al macho a reanudar la cópula (Dorantes, 2019). Sin embargo se ha observado que algunos estímulos pueden provocar la reanudación de la cópula durante un periodo refractario relativo (Hull & Rodríguez-Manzo, 2009; Tlachi-López *et al.*, 2012).

Al realizar pruebas de conducta sexual, se debe llevar el registro del número de intromisiones, el número de montas, el número de eyaculaciones, así como también las latencias respectivas entre cada uno de estos parámetros y el intervalo post-eyaculatorio. En las pruebas de conducta sexual, la latencia de monta (LM) hace referencia al tiempo que transcurre entre la presentación de la hembra estímulo al macho en la caja donde se realiza la prueba de conducta sexual y el inicio de la primera monta. La latencia de intromisión (LI) hace referencia al tiempo que transcurre entre la presentación de la hembra estímulo o incentivo al macho en la caja donde se realiza la prueba de conducta sexual y el inicio de la primera intromisión mientras que la latencia de eyaculación (LE) hace referencia al tiempo que transcurre entre la primera intromisión y la eyaculación (Beck *et al.*, 2002).

5.2. *Comportamiento sexual en ratas hembra*

Una vez que se alcanza la madurez sexual, el comportamiento femenino depende de los niveles cíclicos de las hormonas sexuales ováricas, principalmente estrógeno y progesterona, que combinan la receptividad con la fertilidad (Lenschow & Lima, 2020). Los folículos ováricos en desarrollo secretan estradiol hacia la circulación periférica (Micevych & Meisel, 2017). La esteroidogénesis en los folículos ováricos es estimulada por las gonadotropinas liberadas por la hipófisis. A medida que transcurre el ciclo, los niveles de estradiol circulante aumentan hasta que alcanzan un pico en la tarde del proestro (Shulman & Spritzer, 2014). Este estradiol actúa en el circuito mesolímbico dopaminérgico para aumentar la motivación y en el hipotálamo (núcleo arcuato y ventromedial) para aumentar la receptividad (Micevych & Meisel, 2017). El estradiol induce la expresión de los receptores de progesterona, sin los cuales la progesterona no es eficaz para inducir el comportamiento proceptivo (Parson *et al.*, 1981).

El comportamiento sexual en hembras se divide en tres componentes: atractividad, proceptividad y receptividad (Beach, 1976; Micevych & Sinchak, 2008). La atractividad comprende eventos no conductuales, como la emisión de señales odoríferas (feromonas) que hacen atractiva a la hembra para un macho sexualmente activo (González *et al.*, 2015). La proceptividad se refiere a todos aquellos comportamientos encaminados a atraer a una posible pareja sexual. El despliegue de los comportamientos proceptivos mejora el atractivo y, por lo tanto, desencadena respuestas apetitivas complementarias (Beach, 1976). Los comportamientos de proceptividad por parte de la hembra comprenden brincos, carreras en zig zag y movimiento de orejas para incitar al macho a copular (Dorantes, 2019; Hull & Rodríguez-Manzo, 2009; Micevych & Meisel, 2017).

La receptividad de la hembra muestra si sus condiciones hormonales son adecuadas para aceptar los intentos de monta por parte del macho (Micevych & Meisel, 2017). Una de las posturas fundamentales en el comportamiento sexual de las hembras es la lordosis, movimiento en el cual, la hembra arquea la espalda, estira las patas traseras y retira la cola para facilitar la penetración

vaginal por parte del macho (intromisión) (ver punto 5.1). Esta postura incluye un arco estereotipado de la espalda, elevación de los cuartos traseros, dorsiflexión de la cola y extensión del cuello (Micevych & Meisel, 2017). La lordosis solo se presenta cuando están en celo coincidiendo con la ovulación (Boling & Blandau, 1939). El ciclo estral en ratas dura de 4 a 5 días y se divide en las siguientes etapas: proestro, estro, metestro y diestro. En condiciones normales, la hembra presenta comportamientos de lordosis alrededor de la fase tardía del proestro y el día uno del estro que coincide con la ovulación y con comportamientos de proceptividad, resultado del incremento de estrógenos, progesterona, prolactina, hormona luteinizante y hormona foliculoestimulante (Marcondes *et al.*, 2002). En condiciones experimentales, estos comportamientos se inducen con la administración de progesterona y estradiol posterior a la ovariectomía (Micevych & Meisel, 2017; Micevych & Sinchak, 2013). Tanto los movimientos de las orejas como la lordosis se activan mediante la estimulación táctil del macho (Le Moëne & Ågmo, 2019). La hembra entonces, se acerca al macho y huye con movimientos rápidos o saltos. A este comportamiento se le llama sollicitación, el cual también se realiza a través de señales químicas (feromonas), auditivas y visuales (Beach, 1976; Hull & Rodríguez-Manzo, 2009). Es durante el estro, que la rata hembra muestra esta variedad de comportamientos de sollicitación complejos que desencadenan el comportamiento copulatorio del macho (Snoeren *et al.*, 2014).

5.3. *Motivación sexual*

El comportamiento sexual se activa por la motivación (Le Moëne & Ågmo, 2019). La motivación es un concepto y no una entidad física que es definida por Ågmo (2014), como aquellos mecanismos que determinan la activación, dirección y persistencia de la conducta, dirigidas hacia un incentivo. Son todas aquellas respuestas a clases específicas de estímulos (Ågmo, 2011). Los estímulos que producen un comportamiento de aproximación suelen tener propiedades gratificantes y se denominan incentivos (Paredes, 2014). Un incentivo es cualquier estímulo que activa una conducta de aproximación (Ågmo, 1999; Paredes, 2009). El valor gratificante de un incentivo, para animales no

humanos, lo inferimos con el comportamiento de aproximación mostrado por el sujeto (Ventura-Aquino *et al.*, 2018) y la intensidad de las conductas de acercamiento que es un indicador de la intensidad de la motivación sexual (Ágmo, 2003). Así pues, la motivación sexual es, por tanto, un caso de motivación incentivada (Ágmo, 1999, 2003). En investigaciones anteriores (Ágmo, 2003) se demostró que la rata hembra es un incentivo sexual incondicionado para un macho y que la intensidad de la conducta de aproximación o acercamiento que muestra el macho hacia la hembra aumenta conforme aumenta su experiencia sexual.

5.4. *Conductas motivadas*

Las conductas motivadas u orientadas a una meta son voluntarias, variables, impredecibles y frecuentemente anticipatorias por lo cual, utilizan aspectos cognoscitivos asociados al aprendizaje y a la planeación (Hernández, 2002). Existen motivos primarios y secundarios (o “superiores”). Los motivos primarios corresponden a necesidades biológicas que son cruciales para la supervivencia del individuo, por ejemplo, comer y beber. Por otro lado, los motivos secundarios corresponden a las necesidades de protección, seguridad, afecto y valoración. Aquí entran aquellos comportamientos con aspectos sociales como el comportamiento materno, el juego y los comportamientos sexuales (Hernandez, 2002; Paredes, 2014). A pesar de que los motivos secundarios no son cruciales a nivel individuo, lo son a nivel especie. En el caso de la conducta sexual, este comportamiento, al ser gratificante, favorece la reproducción y por lo tanto, la supervivencia de la especie (Paredes, 2014). Esto se ha demostrado por medio del paradigma de preferencia de lugar que es el método más utilizado para evaluar estados afectivos positivos y efectos gratificantes de comportamientos naturales o de diferentes estímulos como drogas (Paredes, 2009).

Los estados motivacionales son capaces de generar la ejecución de una conducta (Hernandez, 2002) por medio de la integración y el procesamiento de información sensorial proveniente del medio interno y del externo, por parte del SNC. Es decir, el aspecto motivacional de la conducta, implica un procesamiento

sensorial, visceral, humoral y motor con carácter integrativo. Por lo tanto, los estados motivacionales cumplen con tres funciones (Hernández, 2002):

1. Función activadora: aumentan el nivel de alertamiento (*arousal*).
2. Función directiva: guía la conducta hacia una meta específica.
3. Función organizadora: combina todos los componentes de la conducta para dar una respuesta coherente al comportamiento, pudiendo así alcanzar una meta específica o evitar una situación aversiva gracias al llamado circuito de transición de la motivación a la acción.

La evaluación en humanos de aspectos motivacionales se puede realizar de manera sencilla al preguntar qué tan gratificante o no es un estímulo. Sin embargo, en animales no humanos, esto dependerá de los comportamientos de aproximación (Paredes, 2014). Existen varios métodos o paradigmas para evaluar ciertos aspectos motivacionales de la conducta sexual en roedores. De forma indirecta, en todas las conductas motivadas, como la conducta sexual, se suele separar la fase apetitiva de la consumatoria. En el caso de la conducta sexual, la apetitiva hace referencia a la fase pre-copulatoria y la consumatoria a las fases copulatoria y post-copulatoria considerando a la apetitiva como conductas indicadoras de motivación sexual y a la consumatoria como indicadores de la ejecución sexual (Hernández, 2002).

Existen varios métodos para estudiar los aspectos motivacionales asociados a la conducta sexual entre los que podemos mencionar los métodos como la respuesta operante, la prueba de preferencia de pareja (PPP), el laberinto en T (*T-Maze*) y la prueba de motivación sexual incentiva (MSI) (Paredes, 2009; Ventura-Aquino & Paredes, 2017). Las respuestas operantes, también llamadas instrumentales, son comportamientos guiados por consecuencias mediante reforzadores positivos naturales, como el sexo, los alimentos o bien por reforzadores de segundo orden. La PPP es un método efectivo para evaluar conductas de aproximación y consumatorias con interacciones sociales y sexuales. A diferencia de las pruebas de preferencia sexual en donde se busca la medición combinada de acercamiento y comportamientos consumatorios, la prueba de MSI es utilizada para medir únicamente la conducta de acercamiento o aproximación (Paredes, 2009; Ventura-Aquino & Paredes, 2017). En la prueba de MSI los sujetos pueden ver, oler y oír a los estímulos, pero no tener contacto

físico con ellos (Paredes, 2009; Ventura-Aquino & Paredes, 2017) de esta forma se evalúa el valor de un incentivo específico ya que este activa una conducta de aproximación.

En este proyecto se utilizó la Prueba de Preferencia de Pareja (PPP) y la prueba de Motivación Sexual Incentiva (MSI), como métodos para evaluar la activación de ciertos circuitos neuronales, producto de la experiencia sexual adquirida por ratas macho durante 10 semanas, ya que tanto la fase motivacional como la fase ejecutiva son fundamentales para que se lleve a cabo la conducta sexual. Con esto, se busca conocer más sobre las estructuras neuronales involucradas tanto en la ejecución como en la motivación de la conducta sexual y determinar si esta induce cambios plásticos reflejados en la expresión de proteínas sinápticas.

5.5. *Sistemas dopaminérgicos como activadores de la conducta sexual*

Dentro de las aminas biogénicas se encuentran 3 tipos de neurotransmisores, las catecolaminas, las indolaminas y las imidazolaminas (Purves *et al.*, 2004). La dopamina (DA) es uno de los neurotransmisores que pertenece a la familia de las catecolaminas, junto con la noradrenalina y la adrenalina (Giuliano & Allard, 2001; Purves *et al.*, 2004). La DA puede liberarse y/o actuar de forma diferencial tras los efectos de los esteroides como las hormonas sexuales (Hull *et al.*, 2004). Los receptores para DA, todos de tipo metabotrópico, se han clasificado en dos familias: los receptores de la familia D₁ que incluyen a los subtipos D₁ y D₅, y los receptores de la familia D₂ incluyendo a los subtipos D₂, D₃ y D₄ (Purves *et al.*, 2004).

La DA juega un papel importante en la regulación del comportamiento sexual masculino (Hull & Rodríguez-Manzo, 2017). Evidencia sobre el tema se menciona en la revisión realizada por Hull y colaboradores (2004) en donde analizan lo que sucede en la conducta sexual, al utilizar agonistas y antagonistas de receptores a DA. Con respecto a lo mismo Giuliano y colaboradores (2001) evidencian alteraciones del comportamiento sexual con efectos negativos tras la administración de antagonistas dopaminérgicos en ratas sexualmente experimentadas, describiendo un aumento de la latencia de intromisión, de

eyaculación, así como una disminución de la conducta sexual en ratas macho (Giuliano & Allard, 2001; Melis & Argiolas, 1995). Por el contrario, agonistas dopaminérgicos administrados sistémicamente, como la apomorfina, bromocriptina, pergolida o lisurida, facilitan la cópula de los machos en presencia de hembras receptivas (disminuyen la latencia de intromisión) y reducen el umbral eyaculatorio (disminuyen el número de intromisiones y la latencia de eyaculación) (Melis & Argiolas, 1995). De igual manera, un agonista selectivo del receptor D₁, SKF-38393, provoca el aumento en el número de conductas copulatorias, así como el tiempo que pasó en un compartimento con una hembra en celo, lo que sugiere que la dopamina mejora la motivación sexual y la conducta copulatoria (Beck *et al.*, 2002). La DA se libera antes y/o durante la cópula en varios sitios integradores como por ejemplo, el sistema nigroestriatal, el sistema mesolímbico y el sistema del área preóptica medial, lo que facilita la motivación sexual, el desempeño motor y los reflejos genitales (Hull *et al.*, 2004).

Existe evidencia suficiente sobre el papel que juega la DA en la motivación sexual y en la conducta sexual en general. Sin embargo, a pesar de estas evidencias, hay discrepancias sobre si la DA efectivamente regula este tipo de comportamientos posiblemente debido a las dosis, las vías de administración, los métodos empleados, entre otras (Paredes & Ágmo, 2004). Se ha mencionado que este neurotransmisor más bien juega un papel generalizado en comportamientos asociados con respuestas tanto aversivas como gratificantes teniendo más un papel como activador general de conducta (Alcaro *et al.*, 2007).

Los somas de las neuronas dopaminérgicas se encuentran mayoritariamente en el mesencéfalo dando lugar a 4 sistemas: el sistema mesoestriatal dorsal y ventral o nigroestriatal, el sistema mesolímbico, el sistema mesocortical y el sistema tuberohipofiseal o tuberoinfundibular (Hull *et al.*, 2004; Kandel *et al.*, 2001; Purves *et al.*, 2004). De igual manera, existen otras vías dopaminérgicas como lo es el sistema periventricular (incerto-hipotalámico) (Kandel *et al.*, 2001) y el sistema del área preóptica medial. La salida de estos sistemas controla la expresión de la motivación sexual, los reflejos genitales, reflejos somatomotores, y los patrones de cópula (Hull *et al.*, 2004). El sistema nigroestriatal es importante para el control del movimiento y los mecanismos de recompensa (Kandel *et al.*, 2001; Purves *et al.*, 2004). El sistema mesolímbico

es fundamental para el comportamiento y el refuerzo del apetito y es considerado fundamental en la fase apetitiva de la conducta sexual (Hull *et al.*, 2004). El sistema mesolímbico al igual que el mesocortical son importantes para los afectos, las emociones y la motivación (Kandel *et al.*, 2001). El sistema incerto-hipotalámico contribuye a los reflejos genitales, así como a la motivación específicamente sexual (conductas motivadas) y los patrones motores de la cópula (Hull *et al.*, 2004). El sistema tuberoinfundibular controla la producción de leche durante la lactancia (Purves *et al.*, 2004) y regula la secreción de hormonas (Kandel *et al.*, 2001).

El área preóptica medial (MPOA, por sus siglas en inglés), desempeña un papel de suma importancia en el comportamiento sexual de los machos ya que esta área recibe información de todas las modalidades sensoriales y contiene gran cantidad de receptores de hormonas esteroideas que permiten un procesamiento de los estímulos sexualmente relevantes (Hull *et al.*, 2004). Dos circuitos cerebrales dopaminérgicos están implicados directamente en la regulación del comportamiento sexual masculino en ratas: el sistema dopaminérgico incerto-hipotalámico y sistema mesolímbico (Guadarrama-Bazante & Rodríguez-Manzo, 2019). En estos circuitos participa la MPOA, el núcleo accumbens (NAcc, por sus siglas en inglés), el área tegmental ventral (VTA, por sus siglas en inglés) y todos, al activarse, facilitan la expresión de la conducta copulatoria en ratas macho con experiencia sexual (Guadarrama-Bazante & Rodríguez-Manzo, 2019).

El núcleo paraventricular (PVN, por sus siglas en inglés) del hipotálamo es ampliamente innervado por neuronas dopaminérgicas que pertenecen al sistema incerto-hipotalámico el cual constituye parte importante de la innervación dopaminérgica del hipotálamo (Giuliano & Allard, 2001). El sistema incerto-hipotalámico, inerva varias regiones dentro del hipotálamo, al MPOA y al PVN (Giuliano & Allard, 2001). El sistema incerto-hipotalámico está asociado con la motivación sexual, la función copulatoria y la activación endocrina de la cópula. Este va desde las fibras dopaminérgicas proyectando hacia el MPOA (Guadarrama-Bazante & Rodríguez-Manzo, 2019).

Otro de los sistemas que participan fuertemente en la regulación del comportamiento sexual es el sistema nigroestriatal. El sistema nigroestriatal

mejora la preparación para responder a los estímulos y puede contribuir a la ejecución de movimientos consumatorios, incluida la persecución de la hembra y el montaje, pero no ejerce rol alguno en la fase precopulatoria, por lo cual, es considerado importante en la fase consumatoria pero no en la motivacional (Robbins & Everitt, 1992). Por otro lado, el sistema mesolímbico es de suma importancia para el comportamiento apetitivo y el reforzamiento (Hull *et al.*, 2004).

Es importante recordar que varios de los sistemas anteriormente mencionados, son circuitos dentro de los ganglios basales donde participan las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra (SN) modulando las vías de salida del cuerpo estriado, por lo que estas pueden ser mediadas por receptores D1 o D2 según sea el caso. Gracias a esto, las neuronas nigrales proporcionan entradas excitatorias al cuerpo estriado (caudado y putamen) que inhiben a su vez al globo pálido interno (GPi) estimulando así a la vía directa de los ganglios basales, o proporcionan entradas inhibitorias sobre el caudado y putamen, proyectando al globo pálido externo (GPe) inhibiendo la vía indirecta. Cualquiera de las respuestas de las vías de salida culminaría en la producción de movimiento al generar una desinhibición del tálamo motor, estimulando así a la corteza motora. De esta forma estos circuitos participan en las dos fases de la conducta sexual en machos, tanto en la persecución a la hembra como en la ejecución de movimientos consumatorios haciendo que los estímulos sensoriales provoquen una respuesta motora (Kandel *et al.*, 2001; Purves *et al.*, 2004).

Dado lo anterior, es posible que la DA no provoque el comportamiento directamente, pero puede permitir que los estímulos sexualmente relevantes faciliten la liberación de neurotransmisores excitadores, como el glutamato (Glu). Esto gracias a que la DA elimina la inhibición tónica de las células GABAérgicas o estimula la producción excitatoria glutamatérgica. Por otro lado, el óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés), un posible mediador de la influencia de los esteroides en la liberación de DA y mejorador de la liberación de las catecolaminas (West *et al.*, 2002), activa el eje hipotalámico-pituitario-gonadal (HPG) a través del guanósín monofosfato cíclico (GMPc) y desencadena la liberación de hormonas gonadales que aseguran la preparación de los circuitos

involucrados en la cópula (Hull *et al.*, 2004). La DA, uno de los reguladores del comportamiento sexual, a su vez es regulada de manera rigurosa por el transportador de DA (DAT, por sus siglas en inglés). El DAT es una proteína en las membranas presinápticas de las neuronas dopaminérgicas que al regular el tránsito y disponibilidad de la DA, ayuda a un correcto procesamiento de recompensas importantes en la plasticidad sináptica y en el aprendizaje conductual (DiCarlo *et al.*, 2019).

5.6. *Áreas cerebrales involucradas en la conducta sexual*

Los animales constantemente reciben información a través de estímulos tanto internos como externos que deben ser procesados por el sistema nervioso para así, junto con la experiencia previa, poder emitir una respuesta conductual. Estas acciones, muchas veces resultan beneficiosas para el individuo (y para la especie por cuestiones de supervivencia y adaptación), cuando la respuesta conductual es la apropiada. Para que el comportamiento social, incluido el comportamiento sexual, el cuidado paternal y la agresión, sean considerados como adaptativos, estos comportamientos deben ser gratificantes de alguna manera (O'Connell & Hofmann, 2011).

En ratas, la conducta sexual está bajo el control neuronal de distintas áreas cerebrales. Diversas investigaciones (Coolen *et al.*, 1998; Hurtazo *et al.*, 2008) han demostrado que el NAcc, el pálido ventral (VP, por sus siglas en inglés), el tabique lateral (LS, por sus siglas en inglés), el MPOA del hipotálamo, el estriado (Str, por sus siglas en inglés), el núcleo del ama de la estría terminal (BNST, por sus siglas en inglés), el núcleo preóptico posterodorsal (PD), la amígdala medial (MeA, por sus siglas en inglés), la amígdala basolateral (BLA, por sus siglas en inglés), la sustancia gris periacueductal (PAG, por sus siglas en inglés), el VTA, el núcleo talámico subparafascicular parvocelular (SPFp) están involucradas en la conducta sexual en roedores, así como también el bulbo olfatorio principal (MOB, por sus siglas en inglés), el bulbo olfatorio accesorio (AOB, por sus siglas en inglés) (Turner *et al.*, 2019) y el hipocampo (HPO) (Okuyama, 2018).

A su vez, estas y otras estructuras pertenecen a dos circuitos o redes neuronales: la red del comportamiento social (SBN, por sus siglas en inglés, *Social Behavior Network*) y el sistema de recompensa mesolímbico (MRS, por sus siglas en inglés, *Mesolimbic Reward System*). Estos circuitos regulan el comportamiento y evalúan la importancia de los estímulos y la salida conductual (O'Connell & Hofmann, 2011).

5.6.1. Red del Comportamiento Social (SBN)

La red del comportamiento social modula diferentes conductas incluyendo el comportamiento sexual, la agresión y el cuidado parental (O'Connell & Hofmann, 2011). Las estructuras centrales de esta red neuronal están conectadas recíprocamente y contienen receptores de hormonas esteroides sexuales (O'Connell & Hofmann, 2011). Este sistema neuronal puede reforzar las respuestas a estímulos sobresalientes, por ejemplo, el sexo con un conespecífico (O'Connell & Hofmann, 2011; Paredes, 2009). Comprende las áreas de la MeA, el MPOA, el VMH, el hipotálamo anterior (AH), el LS, la PAG y BNST (Newman, 1999) (Figura 1). Todas las áreas se encuentran en el prosencéfalo basal excepto la PAG que es parte del mesencéfalo. Todos estos nodos están conectados bidireccionalmente y contienen receptores a esteroides sexuales implicados en el control de diversas formas de comportamiento social (Newman, 1999).

5.6.2. Sistema de recompensa mesolímbico (MRS)

El MRS es un sistema neuronal marcadamente conservado, asociado con emociones positivas, que evolucionó para mediar el comportamiento relacionado con aspectos motivacionales de interacción social (Bustos, 2008). Juega un papel importante en el procesamiento de la recompensa, la motivación de las conductas de aproximación, el refuerzo positivo (Berridge & Kringelbach, 2015) y de igual forma se asocia con mayor frecuencia con los efectos gratificantes de la comida, el sexo y las drogas de abuso (Nestler & Carlezon, 2006). En los

mamíferos abarca principalmente regiones cerebrales telencefálicas y es definido como la vía DA desde las neuronas del área tegmental ventral (VTA) del mesencéfalo que proyectan hasta el NAcc o al estriado ventral (O'Connell & Hofmann, 2011), así como a la amígdala, la corteza prefrontal y el neostriado (Berridge & Kringelbach, 2015). Es por ello que este sistema comprende a estructuras como el Str, el NAcc, el VP, el HPO, la BLA y el VTA (O'Connell & Hofmann, 2011) (Figura 1).

Los dos circuitos comparten estructuras como el LS, el BNST y la amígdala medial (MeA como parte del SBN y la BLA considerada parte del MRS) (O'Connell & Hofmann, 2011) (Figura 1). Dentro del comportamiento sexual en machos, una de las estructuras que juega un papel central es MPOA tanto en la motivación sexual como en el desempeño copulatorio (Hull & Dominguez, 2007; O'Connell & Hofmann, 2011). Si bien, ambos circuitos neuronales ayudan al control y procesamiento de los estímulos sexualmente relevantes para ejecutar una respuesta conductual apropiada, es necesaria la recepción de información proveniente de estímulos olfativos. El sistema olfativo cumple con esta función procesando olores volátiles y no volátiles como las feromonas.

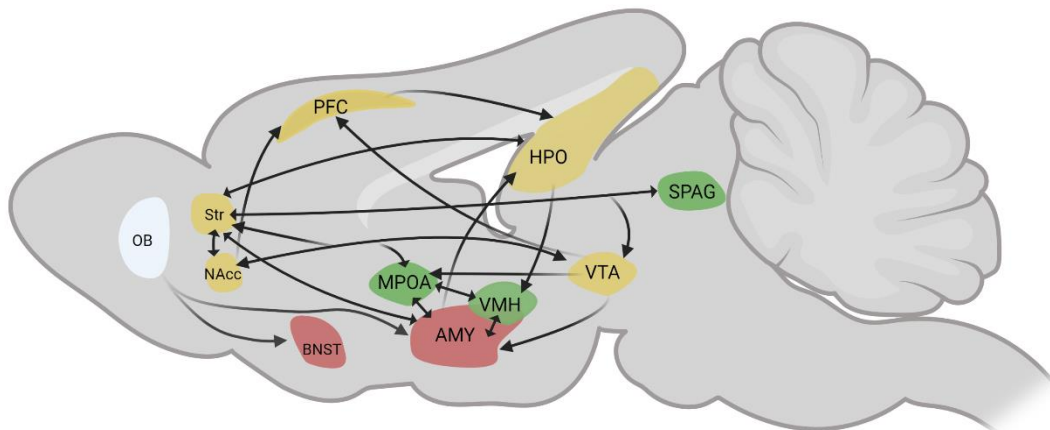


Figura 1. Corte sagital del cerebro de ratona donde se observan las diferentes áreas cerebrales que participan dentro de los circuitos reguladores del comportamiento sexual (SBN y MRS) y sus proyecciones. SBN: *Social Behavior Network*, MRS: *Mesolimbic Reward System*. Amarillo: estructuras que forman parte de MRS. Verde: estructuras que forman parte del SBN. Rojo: estructuras que comparten los dos circuitos. Creado en: BioRender.com. (Adaptado de: Ventura-Aquino *et al.*, 2018).

Debido a que los bulbos olfatorios (MOB y AOB), el VMH, la AMY y el HPO son parte del MRS y SBN y participan en la modulación y coordinación de la conducta copulatoria, en el presente proyecto analizaremos la expresión de la sinaptofisina (ver punto 5.8) en estas cuatro estructuras para determinar su papel dentro de estos circuitos.

A continuación, describiré las principales características de estas cuatro regiones que son objeto de estudio en esta tesis.

5.6.3. Sistema olfativo y bulbos olfatorios

El sistema olfativo se compone del sistema olfatorio accesorio y el sistema olfatorio principal. Las señales quimiosensoriales, como las feromonas, son sumamente importantes dado que los roedores son animales nocturnos y estas son transmitidas desde el VNO al AOB (Hull & Rodríguez-Manzo, 2009). Los olores volátiles son transmitidos a la mucosa nasal cuyos axones penetran a la placa cribiforme y a su vez al MOB. Los olores no volátiles son procesados por el VNO situado en la base de la cavidad nasal el cual proyecta hacia el AOB. El AOB envía eferencias a la amígdala, principalmente a la MeA que está fuertemente involucrada en el comportamiento sexual en roedores macho, y al MPOA. La MeA envía proyecciones al MPOA y otras núcleos reguladores del comportamiento sexual (Hull & Rodríguez-Manzo, 2009).

Diversos estudios han demostrado que la bulbectomía bilateral en roedores altera el comportamiento sexual en machos (Settembrini, 1985) observando déficits en el rendimiento copulatorio (Edwards *et al.*, 1990; Kirkpatrick *et al.*, 1994). Sin embargo, Williams y colaboradores (1991) han demostrado que la bulbectomía en ratas hembra potencia el comportamiento sexual aumentando el reflejo de lordosis y disminuyendo el umbral requerido de estrógenos para inducir proceptividad y receptividad. Este sistema no se limita al control de conductas reproductivas, también se ve involucrado en comportamientos de cuidado maternal, conductas de agresión, hábitos de alimentación, entre otros (Kirkpatrick *et al.*, 1994; Yang & Shah, 2016).

5.6.4. Hipotálamo ventromedial (VMH)

El hipotálamo es una región prosencefálica muy conservada en muchas especies de vertebrados; coordina respuestas fisiológicas, conductuales y ayuda a mantener un estado homeostático (Xie & Dorsky, 2017). El VMH está ubicado en el hipotálamo caudal a lo largo del tercer ventrículo (O'Connell & Hofmann, 2011). De igual forma, al tener conexión con la glándula pituitaria, ayuda a controlar la secreción hormonal endócrina y las respuestas al estrés (Xie & Dorsky, 2017). Contiene un grupo de núcleos que tienen una gran influencia en la coordinación de las conductas de ingesta, de defensa y reproductivas (Swanson, 2000).

Recibe proyecciones de núcleos relacionados con el sistema olfativo como la MeA, el núcleo basal posterior y cortical posterolateral (Sah *et al.*, 2003), es decir, está altamente intercomunicado con la amígdala y otras regiones del hipotálamo (O'Connell & Hofmann, 2011).

El VMH tiene un papel central en la regulación de la receptividad femenina (O'Connell & Hofmann, 2011) y a la vez en los comportamientos defensivos hacia los machos (Hull & Rodríguez-Manzo, 2009; O'Connell & Hofmann, 2011; Sah *et al.*, 2003). También tiene un papel relevante modulando el cuidado parental (O'Connell & Hofmann, 2011; Sheehan *et al.*, 2001).

5.6.5. Amígdala

El complejo amigdalino está ubicado en el lóbulo temporal medial y contiene aproximadamente 13 núcleos (Sah *et al.*, 2003). Estos núcleos están clasificados en 3 grupos: el grupo profundo o basolateral que comprende al núcleo lateral, al núcleo basal y al núcleo basal accesorio, el grupo superficial o cortical que abarca al núcleo cortical y al núcleo del tracto olfatorio lateral y por último, el grupo centromedial, formado por el núcleo medial y el núcleo central (Sah *et al.*, 2003). De igual manera hay otro conjunto de núcleos que no se incluyen dentro de estos grupos. Esta división depende de la organización

arquitectónica y la conectividad intranuclear y extranuclear entre los grupos, los núcleos y los subnúcleos del complejo amigdalino (Sah *et al.*, 2003). La amígdala recibe aferencias de estructuras corticales y talámicas y de estructuras como el hipotálamo y el tallo cerebral. Estas últimas dos áreas suministran información de áreas asociadas con el comportamiento (Sah *et al.*, 2003).

La MeA, proyecta principalmente al hipotálamo (anterior y ventromedial) a través de la estría terminal para modular los comportamientos sociales, incluido el comportamiento sexual (Choi *et al.*, 2005; Sheehan *et al.*, 2001). Algunos estudios han trazado esta vía de proyecciones a través de la activación por estímulos olfativos reproductivos y agresivos (Choi *et al.*, 2005) y otros sobre el estudio del comportamiento de cuidado parental (Sheehan *et al.*, 2001). La MeA es rica en receptores de hormonas esteroideas sexuales (Cooke *et al.*, 2003; O'Connell & Hofmann, 2011) por lo cual participa en el comportamiento sexual y al parecer es crucial para el reconocimiento social de olores en roedores donde participa el sistema vomeronasal y recibe información del bulbo olfatorio principal (Sah *et al.*, 2003). Recibe proyecciones de todas las modalidades sensoriales e incluso de sistemas de memoria por lo que se le atribuye la capacidad de formar asociaciones entre las entradas sensoriales actuales y la experiencia previa (Sah *et al.*, 2003). La experiencia juega un papel muy importante en el desarrollo y eficiencia del comportamiento sexual (Hull & Rodríguez-Manzo, 2017). Además, la amígdala tiene proyecciones hacia regiones hipotalámicas, al sistema de memoria del lóbulo temporal medial con aferencias al hipocampo, entre otros (Sah *et al.*, 2003).

La amígdala modula los mecanismos de acercamiento que evocan comportamientos sociales y exploratorios, y comportamientos de evitación que evocan retraimiento y huida (Miller *et al.*, 2019) como es el caso de los comportamientos de aproximación y evitación en la conducta sexual. Así mismo, la asociación de la información sensorial con la memoria emocional permite que el animal produzca una respuesta conductual apropiada a un estímulo social y si es gratificante, como el caso de una potencial pareja sexual, se lleve a cabo una conducta de aproximación (O'Connell & Hofmann, 2011). Se han observado alteraciones en el comportamiento sexual al inducir lesiones bilaterales en el núcleo medial de la amígdala, que está conectado con la BNST y el MPOA. Estas

alteraciones se reflejaron al observar un aumento en la latencia de monta, aumento en la latencia de intromisión, aumento de los intervalos de montas e intromisiones al igual que un mayor número de intromisiones antes de llegar a eyaculación (Lehman *et al.*, 1983; Settembrini, 1985).

5.6.6. Hipocampo (HPO)

El hipocampo es una de las áreas denominadas nichos de precursoras neuronales que tienen la capacidad de generar nuevas neuronas incluso en la vida adulta (Leal-Galicia *et al.*, 2019), siendo el giro dentado (DG, por su siglas en inglés) del hipocampo el mayor sitio de neurogénesis (Glasper & Gould, 2013). La relevancia de la neurogénesis radica en la mejora del funcionamiento del cerebro y aumento de los comportamientos adaptativos como lo es el comportamiento sexual, permitiendo al individuo adaptarse a los cambios constantes del entorno (Leal-Galicia *et al.*, 2019).

Tras ciertas investigaciones mencionadas por Leal-García y colaboradores (2019), se ha sugerido que la conducta sexual podría inducir o estimular la neurogénesis en el cerebro adulto de mamíferos, incluidos los roedores, como mecanismo de adaptación a estos entornos cambiantes y así poder interactuar con una pareja potencial ya que la neurogénesis adulta hipocampal es considerada un fenómeno de plasticidad sináptica estructural y funcional. En ratas macho adultas jóvenes, la experiencia sexual aumenta la proliferación celular y la neurogénesis en el hipocampo al igual que en ratas mayores, la experiencia sexual induce la neurogénesis y mejora la función cognitiva (Glasper & Gould, 2013; Leuner *et al.*, 2010).

El hipocampo es fundamental para las representaciones de la memoria relacionada con el entorno y/o experiencias (Humphries & Prescott, 2010). Anteriormente se ha mencionado que, en el caso del comportamiento sexual, la conducta de aproximación es intrínsecamente gratificante y es una medida de preferencia. Por lo tanto, si es gratificante para el individuo, éste recordará la ubicación del estímulo gratificante (en este caso, una pareja sexual potencial) (O'Connell & Hofmann, 2011). En entornos novedosos, cambiantes y complejos,

como los ambientes naturales, los animales deben ir en búsqueda de una pareja sexual potencial. Para lograr esto, necesitarán de una mayor capacidad de aprendizaje, mejores habilidades y mejor memoria visuoespacial (Leal-Galicia *et al.*, 2019).

5.7. *Plasticidad sináptica*

La plasticidad sináptica es el proceso mediante el cual el número y la fuerza de las sinapsis cambian como consecuencia de su uso, resultando en una modificación de las conexiones neuronales y de las redes que estas constituyen (Herrera-Morales *et al.*, 2019). Se dice que la plasticidad sináptica es el resultado de la transformación de cómo se procesan ciertos estímulos (Herrera-Morales *et al.*, 2019), que a su vez, producen cambios en el comportamiento.

La conducta sexual no es un proceso estático. El comportamiento sexual cambia a medida que el animal va adquiriendo experiencia sexual (Herrera-Morales *et al.*, 2019). Debido a esto se plantea la idea de posibles cambios plásticos inducidos por la conducta sexual y por la adquisición de experiencia. El aprendizaje sexual, definido por Woodson (2002) es un cambio duradero en un comportamiento apetitivo o consumatorio específico de una especie después de cualquier experiencia social o sexual durante el desarrollo o la vida adulta. La experiencia sexual puede inducir cambios fisiológicos, como la liberación de hormonas sexuales, que tienen la capacidad de influir en la plasticidad sináptica del SNC de diversas formas. Los niveles hormonales diferenciales dan como resultado patrones sinápticos sexualmente dimórficos en varias estructuras del SNC provocando cambios morfológicos y fisiológicos por ejemplo, en el número de neuronas, el volumen nuclear, el número de receptores de neuropéptidos, la longitud dendrítica, la organización de la membrana neuronal, cambio en las células gliales las cuales están íntimamente asociadas con la formación sináptica, la remodelación sináptica, entre otros (García-Segura *et al.*, 1994).

La actividad sexual (y por lo tanto, la experiencia sexual) también puede inducir cambios plásticos morfológicos en el SNC, neurogénesis, sinaptogénesis, cambios conductuales, tanto en hembras como en machos (Herrera-Morales *et al.*, 2019). En estudios con ratas macho con un solo episodio de experiencia

sexual e inyectadas con BrdU, un análogo de la timina e indicador de proliferación celular, se encontraron niveles circulantes elevados de corticosterona a causa de la experiencia sexual aumentando así la proliferación celular en el giro dentado (Leuner *et al.*, 2010). Por otro lado, el aspecto gratificante del apareamiento comparte características en común con el correr, una experiencia que también eleva los niveles de glucocorticoides y promueve la eficiencia neuronal en el hipocampo al aumentar el número de contactos dendríticos, el número de espinas dendríticas, lo cual lleva a un aumento de la plasticidad estructural y la neurogénesis (Cotman *et al.*, 2007; Leuner *et al.*, 2010). De esta manera se promueve la mejora del aprendizaje y la memoria (Leuner *et al.*, 2010). En el mismo estudio mencionan que en ratas con 14 días de experiencia sexual (experiencia sexual crónica) no hubo aumento de corticosterona, pero si mejoró el número de espinas dendríticas, aumentó la longitud total dendrítica y el número de puntos de ramificación en las neuronas granulares del DG.

En nuestro laboratorio demostramos que la conducta sexual también induce neurogénesis en el sistema de los ventrículos laterales, la vía migratoria rostral (VMR) y los bulbos olfatorios tanto en ratas macho como en hembras. Los cambios se observan tanto en proliferación en la VMR como en la integración de las neuronas nuevas en circuitos preexistentes en los bulbos olfatorios ya que hemos encontrado neuronas nuevas inducidas por la conducta sexual 45 días después de desplegar la conducta en diferentes capas del bulbo olfatorio. Estos datos sugieren que la conducta sexual induce cambios plásticos permanentes (Bedos *et al.*, 2018).

5.8. *La sinaptofisina como marcador de densidad sináptica*

Para una correcta liberación del neurotransmisor, es importante y necesaria la participación de ciertas proteínas que ayuden y controlen el tráfico vesicular, así como también, la presencia de estas tanto en la membrana plasmática como en el citoplasma y en las membranas vesiculares. En algunos estudios (Takamori *et al.*, 2006) se identificaron más de 80 proteínas integrales

de membrana de las cuales, aproximadamente 40 son residentes de las vesículas sinápticas.

Las vesículas sinápticas contienen sinaptofisina (SYP), sinaptobrevina, neurotransmisores, transportadores, Rab3A, sinapsinas y sinaptotagminas (Maeda *et al.*, 2016; Takamori *et al.*, 2006), entre otras, que funcionan como reguladores de la exocitosis. La SYP, también llamada proteína p38, es una de las principales proteínas integrales de la membrana de las vesículas secretoras (Chang *et al.*, 2021) y también una de las primeras en identificarse en estas estructuras representando alrededor del 7-10% del total de las proteínas vesiculares sinápticas (Gincel & Shoshan-Barmatz, 2002; Hami *et al.*, 2016). Se le encuentra de forma ubicua en las neuronas de todo el cerebro (Navone *et al.*, 1986). Es una proteína integral de la membrana de las vesículas secretoras que consta de seis monómeros de 38 kDa (Hami *et al.*, 2016). Contiene cuatro dominios transmembranales con su extremo N-terminal y su extremo C-terminal en el citoplasma (Gordon & Cousin, 2014).

La SYP tiene una importante participación en procesos tales como la formación de canales o poros para la liberación de neurotransmisores (Arthur & Stowell, 2007) y el reciclaje de vesículas sinápticas (Aizawa & Yamamuro, 2020; Evans & Cousin, 2005). También se ha demostrado que la expresión de SYP se correlaciona con la sinaptogénesis durante el desarrollo del sistema nervioso central (Elibol-Can *et al.*, 2014). Algunos estudios mencionan la participación que tienen ciertos biomarcadores como SYP y GAP-43 (*growth-associated protein*, también denominada F1, neuromodulina, B-50) en cambios plásticos estructurales inducidos por el aprendizaje (Grijalva *et al.*, 2021). Debido a esto, la sinaptofisina y otras proteínas vesiculares sinápticas, junto con proteínas que pertenecen a las densidades postsinápticas como PSD-95, se han relacionado con mecanismos de neuroplasticidad (Davies *et al.*, 2003; Glantz *et al.*, 2007), neurotransmisión y, por lo tanto, se considera un marcador confiable que puede utilizarse para determinar la distribución y la densidad de las sinapsis funcionales (Glantz *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010; Tata *et al.*, 2021). Por ello, en el presente trabajo, se utilizará la sinaptofisina como marcador de densidad sináptica, la cual se evaluará mediante la técnica de estereología en tres dimensiones (X, Y y Z).

5.9. *Técnicas de evaluación de actividad neuronal*

El procesamiento de estímulos durante la conducta sexual y la experiencia sexual se ha observado mediante la evaluación de actividad neuronal con estudios de lesiones, de estimulación eléctrica, por trazado de vías, inmunoreactividad de c-Fos (Snoeren *et al.*, 2014) y algunas otras técnicas de inmunohistoquímica y neuroimagen. La evaluación *in vivo* de la actividad neuronal como es el caso de la resonancia magnética funcional (MRI, por sus siglas en inglés), así como muchas otras técnicas de neuroimagen comúnmente utilizadas, tienen ciertas desventajas como son el costo, el tiempo o incluso llegar a obtener falsos positivos. Por esa razón muchas veces se opta por técnicas de tinción mediante el marcaje de productos proteicos como lo son la inmunohistoquímica y/o la inmunofluorescencia. Este tipo de técnicas son ampliamente utilizadas dada su rapidez y su versatilidad.

La inmunohistoquímica es una técnica que consiste en el marcaje de proteínas. Esto se lleva a cabo utilizando anticuerpos que tienen especificidad y por lo tanto se unen a las proteínas de interés para así, establecer su presencia y su cantidad. Dentro de las técnicas de inmunohistoquímica (IHC) se encuentra la inmunofluorescencia. Ésta tiene el mismo principio que la inmunohistoquímica sobre el marcaje de proteínas a través de uniones antígeno-anticuerpo, pero se cambia el uso de enzimas por fluorocromos que se unen a proteínas de interés. La tinción por inmunofluorescencia (IF) aprovecha tanto la especificidad de unión de los anticuerpos contra epítomos específicos como la visibilidad selectiva de diferentes longitudes de onda a través de la emisión de luz estimulada (fluorescencia) para localizar la proteína que contiene el epítomo (proteína de interés) dentro de las células o tejidos (Eyers, 2020).

En el presente trabajo evaluaremos la IF para SYP con estereología, que es un método morfométrico de conteo tridimensional que nos permite estudiar la densidad sináptica a partir de planos bi-dimensionales. Es una técnica ampliamente utilizada para estimar el número de sinapsis en ciertas regiones cerebrales e incluso, actualmente, para realizar reconstrucciones 3D de tejidos. Es así como por medio de la estereología podemos estimar el aumento y/o disminución del número de sinapsis derivadas por alguna conducta.

6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La plasticidad sináptica es un proceso importante involucrado en el remodelado de conexiones sinápticas dentro de los circuitos neuronales. Se sabe que la conducta sexual y la experiencia sexual, pueden influir en la plasticidad sináptica de diversas maneras. Aunque existen varias investigaciones referentes a los circuitos neuronales que regulan y controlan la conducta sexual en modelos animales, hasta el momento no hay trabajo alguno que estudie puntualmente cuáles estructuras cerebrales están involucradas en cada una de las dos fases de la conducta sexual: la motivación y la ejecución sexual. A pesar de que ambas fases son necesarias para el despliegue de la conducta sexual, es imprescindible conocer a mayor detalle cuáles estructuras se activan durante la motivación y cuáles durante la ejecución sexual.

Por lo que en el presente estudio se determinará que estructuras cerebrales están involucradas en cada una de las fases de la conducta sexual de ratas macho tras diez semanas de experiencia sexual mediante la utilización de las pruebas de MSI y PPP. De esta manera, se podrán evaluar los cambios plásticos inducidos por la motivación (con la prueba MSI) y la ejecución de la conducta (mediante la prueba PPP) a través de la intensidad de sinaptofisina en cuatro estructuras cerebrales involucradas en el circuito de recompensa sexual: el BO, el VMH, la AMY y el HPO.

7. HIPÓTESIS

La motivación sexual, evaluada a través de la prueba de Motivación Sexual Incentiva (MSI) y la ejecución sexual evaluada a través de la Prueba de Preferencia de Pareja (PPP), inducirán el aumento en la expresión de SYP en el BO, el VMH, la AMY y el HPO, debido a cambios plásticos causados por la experiencia sexual adquirida.

8. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificar cambios plásticos en estructuras cerebrales involucradas en el circuito de recompensa sexual derivados de la activación generada por la adquisición de experiencia sexual.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar los cambios plásticos a través de la expresión de sinaptofisina en el BO, VMH, AMY e HPO tras la adquisición de experiencia sexual en la PPP.
- Evaluar los cambios plásticos a través de la expresión de sinaptofisina en el BO, VMH, AMY e HPO tras la adquisición de experiencia sexual en la prueba de MSI.

9. MATERIAL Y MÉTODOS

9.1. *Animales*

Se utilizaron 30 ratas (*Rattus norvegicus*) macho de la cepa Wistar (300-350 gr) las cuales de forma aleatoria se asignaron a uno de los tres grupos siguientes: control (n=10), MSI (n=10) y PPP (n=10). Como animales estímulos se utilizaron ratas macho de la misma cepa que recibieron previo entrenamiento para considerarse sexualmente expertos (ver punto 9.3 y punto 9.4.1). De igual forma se utilizaron ratas hembra de la misma cepa a las que se les realizó una ovariectomía con anticipación a las pruebas conductuales, para ser utilizadas como estímulo durante las pruebas. La receptividad y proceptividad de las hembras posterior a la ovariectomía se indujeron mediante la administración de benzoato de estradiol (25 µg/kg) y progesterona (1 mg/kg) 48 y 4 horas antes de cada prueba, respectivamente. El vehículo donde se disolvieron estas hormonas fue aceite comestible o aceite de oliva.

Todos los animales se mantuvieron a una temperatura ambiente constante. Dado que las ratas son animales nocturnos, se mantuvieron en un ciclo invertido luz/oscuridad de 12/12 horas, con agua y alimento *ad libitum*. Los animales fueron proporcionados por el Bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México con registro de funcionamiento vigente bajo la NOM-062-ZOO-1999/ y SADER-SENASICA AUT-B-C-0815-024.

9.2. *Ovariectomía*

Las ratas fueron anestesiadas vía intraperitoneal con ketamina y xilacina a una concentración 7:3 respectivamente a una dosis de 1 ml/kg cada rata para inducir anestesia profunda. Se rasuraron y se hizo una pequeña incisión central con tijeras quirúrgicas en el vientre bajo. Ya realizada la incisión en la piel, se continuó con la fascia y la capa muscular. Encontrados los ovarios se cortaron, se extrajeron y se ligaron las trompas, finalmente se suturó tanto la capa muscular como la piel con hilo quirúrgico. Se limpió la herida y se colocó Furacine

de uso veterinario, con nitrofurazona como principio activo con función antimicrobiana.

9.3. *Entrenamiento de animales estímulos*

Se realizaron pruebas de conducta sexual en cajas de acrílico de 60 x 40 x 30 cm durante 30 minutos con una hembra sexualmente receptiva durante 5 semanas (una prueba de 30 minutos cada semana). Las ratas hembra ovariectomizadas se inyectaron con benzoato de estradiol y progesterona 48 y 4 horas antes de cada prueba conductual, respectivamente, para inducir receptividad y proceptividad. Las ratas macho que eyacularon mínimo 3 veces en 3 sesiones de conducta sexual de 30 minutos, fueron seleccionadas como animales estímulo (sexualmente expertos) para el experimento.

Los sujetos que participaron en el experimento no tenían experiencia sexual y fueron aleatoriamente divididos en 3 grupos. El grupo control no fue expuesto a hembras sexualmente receptivas. Los otros dos grupos fueron entrenados en la prueba de preferencia de pareja o en la de motivación sexual incentiva.

9.4. *Pruebas de conductas motivadas*

La prueba de preferencia de pareja (PPP) se realizó una vez por semana durante 10 semanas. La prueba de motivación sexual incentiva (MSI) se realizó en la semana 1, 5 y 10. Las semanas restantes, las ratas macho inexpertas se aparearon con una hembra sexualmente receptiva en las cajas de cópula en sesiones de 30 minutos (Figura 2). En ambas pruebas se llevó a cabo el registro del número de intromisiones, el número de montas, así como también las latencias respectivas. Las ratas control no pasaron por estas pruebas, durante las 10 semanas se colocaron en las cajas de cópula sin la presencia de animales estímulo.

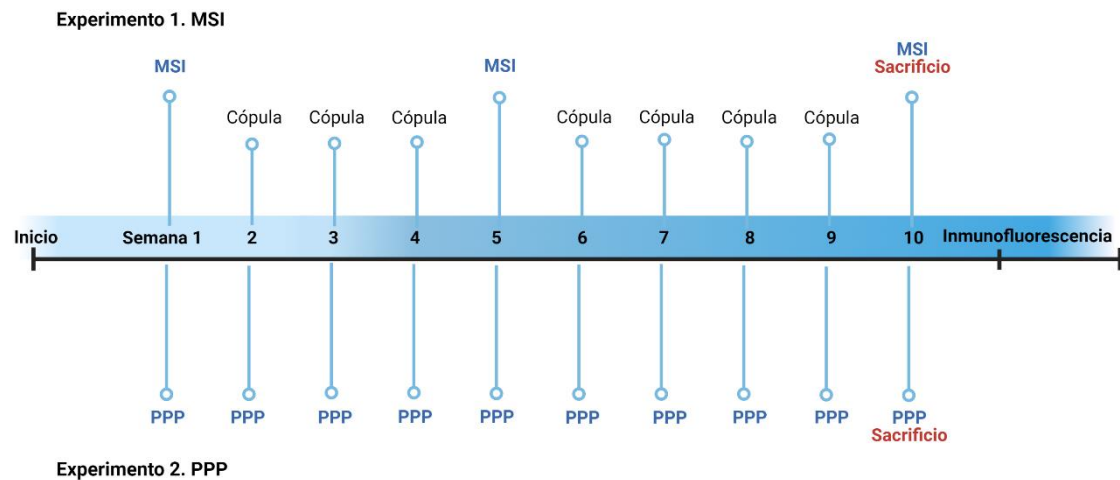


Figura 2. Esquema representativo de la cronología utilizada en los experimentos de las pruebas de conductas motivadas MSI y PPP durante 10 semanas.

9.4.1. Prueba de Preferencia de Pareja (PPP)

La preferencia de pareja es evaluada en una caja de madera (95 × 30 × 32 cm) con tres compartimentos iguales con viruta de madera en el piso (Figura 3). El compartimento central donde se coloca al sujeto experimental se comunica con los compartimentos laterales a través de puertas corredizas (10 × 10 cm). En cada compartimento lateral se coloca un animal estímulo: un macho sexualmente experto en uno, y en el otro a una hembra sexualmente receptiva. Los animales estímulo están sujetos por un arnés atado a la parte trasera del compartimento con una cuerda flexible, lo que permite cierta libertad de movimiento dentro de su compartimento y por lo tanto desplegar la conducta sexual. Durante la prueba, se coloca al sujeto experimental (animal inexperto) en el compartimento central durante 1 minuto, se levantan las puertas corredizas y se toma el registro del tiempo que permaneció en cada compartimento, así como también se registran los parámetros sexuales desplegados por el macho (actos copulatorios) hacia los animales estímulos. La prueba dura 15 minutos.

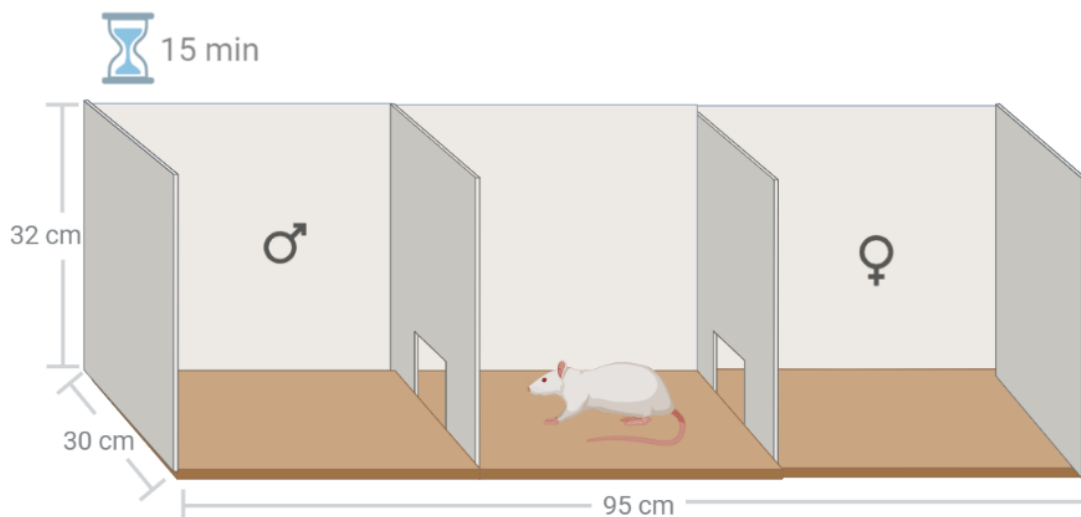


Figura 3. Paradigma Prueba de Preferencia de Pareja (PPP). Consiste en tres compartimentos donde se coloca a los animales estímulo (un macho sexualmente activo y una hembra sexualmente receptiva) a los laterales y al sujeto experimental en el central. El animal experimental tiene libertad de movimiento entre los compartimentos mientras que los estímulos están sujetos con un arnés. La prueba dura 15 minutos. Creado en: BioRender.com

En esta prueba si los sujetos repiten una elección o muestran una clara preferencia por un animal estímulo, se asume que la conducta de aproximación es intrínsecamente gratificante y es una medida de preferencia (Paredes, 2009). Para las ratas macho, una hembra receptiva es un incentivo incondicional que activa comportamientos de aproximación; los machos sexualmente activos muestran una clara preferencia de pareja hacia una hembra receptiva (Ågmo, 2003). Sin embargo, el macho sexualmente activo es colocado también como estímulo, tanto en la prueba MSI (ver punto 9.4.2) como en la PPP, ya que algunos machos muestran preferencia hacia parejas sexuales de su mismo sexo. Lo anterior puede ser debido principalmente a sus condiciones de crianza (Zenchak & Anderson, 1980). Esta idea es apoyada por investigaciones donde se menciona que aquellos animales que exhiben preferencias de pareja de su mismo sexo, han experimentado ambientes hormonales perinatales que son más típicos del sexo opuesto, es decir, que han experimentado una exposición por debajo del umbral o una respuesta a la testosterona que es más típica de las hembras (Roselli *et al.*, 2011). De igual forma, Price (1987) demostró que la exposición temprana de los machos a las hembras, aumentará la probabilidad de que los machos se vuelvan sexualmente activos, pero no evitará que algunos

machos estén orientados hacia los machos o tengan un desempeño bajo. Las ratas de laboratorio (en este caso machos), inmediatamente después del destete, son asignados a cajas con individuos de su mismo sexo (separados de las hembras). Estudios anteriores (Katz *et al.*, 1988; Zenchak & Anderson, 1980) han probado la hipótesis de que la exposición exclusiva a los machos después de la crianza y la falta de experiencias sociales con las hembras podrían conducir a preferencias orientadas hacia los machos. Algunas otras hipótesis que podrían dar explicación al desarrollo de preferencias sexuales entre individuos del mismo sexo son la existencia de diferencias cerebrales (estructuras cerebrales sexualmente dimórficas), determinantes genéticos y un procesamiento sensorial diferencial (principalmente olfativas) (Zenchak & Anderson, 1980).

Para los machos, el índice de preferencia se calcula dividiendo el tiempo que pasa el macho experimental con el incentivo hembra entre la sumatoria del tiempo que pasa el macho experimental con el incentivo macho más el tiempo que pasa con el incentivo hembra.

$$\text{Índice de preferencia} = \frac{TH}{TM + TH}$$

TH: Tiempo que pasa con la hembra

TM: Tiempo que pasa con el macho

Un índice de preferencia igual a 0.5 indica que el sujeto experimental no tiene preferencia por ninguno de los dos estímulos. Un índice de preferencia menor a 0.5 indica que el sujeto experimental tiene preferencia por la hembra sexualmente receptiva y el puntaje de preferencia mayor a 0.5 indica preferencia por el macho sexualmente receptivo.

9.4.2. Motivación Sexual Incentiva (MSI)

La MSI fue evaluada en una caja central de acrílico negra (100 x 50 cm) con dos compartimentos adicionales colocados en esquinas diagonalmente opuestas por fuera de la caja principal (Figura 4). En cada compartimento adicional se coloca a un animal estímulo, un macho sexualmente experto y una hembra sexualmente receptiva. En el compartimento principal se coloca al

animal experimental. En esta prueba, el sujeto puede oler, escuchar y ver a los sujetos estímulo (incentivos), pero no tiene contacto físico con ellos ya que los compartimentos adicionales están divididos el uno con el otro por una malla de alambre (Paredes, 2009; Ventura-Aquino *et al.*, 2018). Se estableció una zona incentiva (20 x 30 cm) contigua al compartimento de cada animal estímulo por dentro del compartimento principal. Se registró el tiempo que pasan las ratas experimentales en cada zona incentiva, así como el número de visitas a la misma (Paredes, 2009; Portillo & Paredes, 2004). Cada sesión duró 10 minutos. Previo a la prueba, se realizaron tres sesiones de 10 minutos cada una para la adaptación de los sujetos al ambiente experimental.

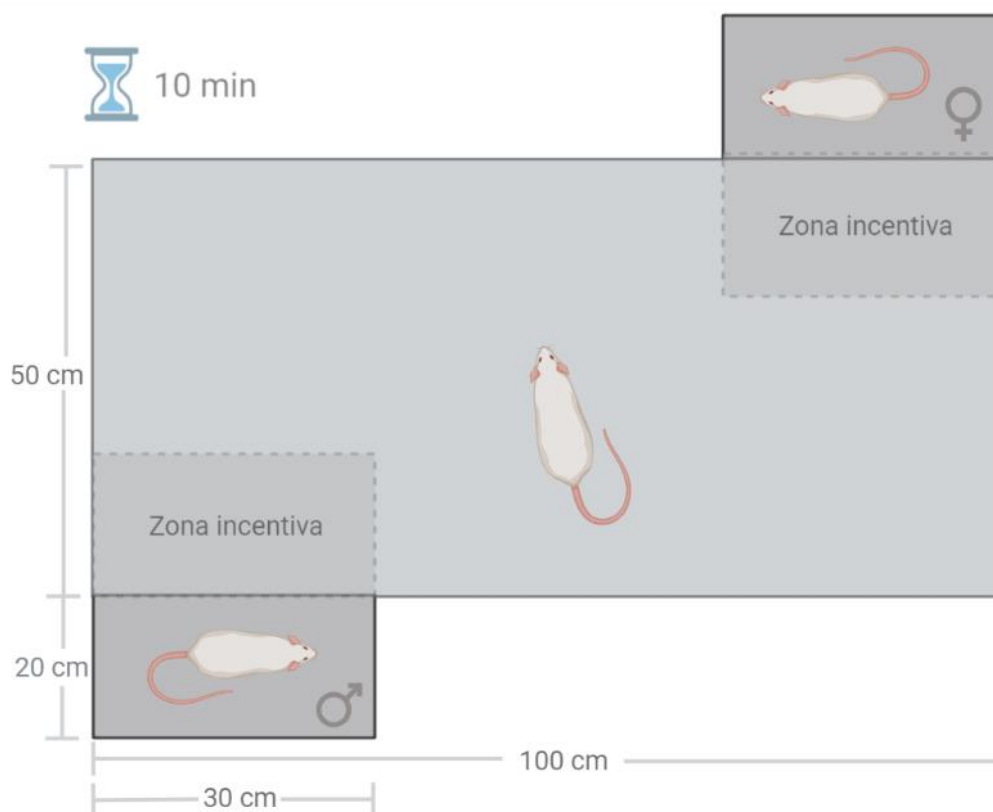


Figura 4. Paradigma donde se evaluó la Motivación Sexual Incentiva (MSI) Creado en: BioRender.com.

9.5. Cortes histológicos

Después de las 10 semanas de entrenamiento, las ratas fueron anestesiadas intraperitonealmente con pentobarbital sódico a una dosis de 10 mg/kg. Se realizó perfusión intracardiaca con una solución fisiológica (PBS) y una solución fijadora (PFA). Al finalizar se decapitaron con el fin de obtener los

cerebros. Los tejidos se fijaron con paraformaldehído al 4 % por una hora y transcurrido este tiempo se transfirieron a un frasco con solución de sacarosa al 30% y fueron etiquetados respectivamente.

La selección de los cerebros de las ratas fue de manera azarosa tomando 5 por cada prueba conductual (n=5 PPP; n=5 MSI, n=5 CTRL). Los cerebros se cortaron coronalmente en un criostato Leica modelo CM 1850 a una temperatura de -25 °C con un grosor de 30 µm cada uno y fueron almacenados en una solución anticongelante para su crioprotección en un cuarto frío a 4 °C para su posterior selección.

Para la selección de los cortes, se tomaron en cuenta únicamente aquellas secciones coronales donde se pudieran encontrar las estructuras cerebrales de interés, el VMH, la AMY, el HPO y, por ende, las cinco regiones de interés (ROIs, *Regions Of Interest*, por sus siglas en inglés) analizados CA1, CA3, DG, AMY e VMH. Se seleccionaron aleatoriamente 4 cortes por rata de las coordenadas correspondientes a los planos -2.12 mm, -2.56 mm, -3.14 mm y -3.6 mm respecto a bregma para AMY, HPO e VMH tomando como referencia el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (Paxinos & Watson, 1997). Para las estructuras anteriormente mencionadas, se analizaron un total de 20 cortes por grupo y un total final de 60 cortes coronales.

Para los bulbos olfatorios se realizaron cortes coronales con el mismo grosor y se seleccionaron 4 cortes por rata de las coordenadas 5.2 mm, 5.7 mm, 6.2 mm y 6.7 mm respecto bregma. De igual manera, se obtuvieron y analizaron un total de 20 cortes por grupo y un total final de 60 cortes coronales para el bulbo olfatorio. Así, en total analizamos 120 cortes.

9.6. *Inmunofluorescencia*

Todos los cortes seleccionados recibieron cuatro lavados con PBS (0.1 M, pH 7.2) por 3 minutos cada uno. Para desenmascarar los epítomos se utilizó borohidrato de sodio al 0.5% durante 15 minutos y posteriormente se realizaron 3 lavados de PBS de 3 minutos cada uno. Se bloquearon las peroxidasas endógenas para evitar interferencia de señales propias del tejido con peróxido de hidrógeno al 0.3% durante 30 minutos. Seguido, se realizaron 2 lavados de 5

minutos cada uno con PBT (*Phosphate Buffered Saline* with Tx-100, por sus siglas en inglés) al 1% (Tx-100, para permeabilizar las membranas) y tres lavados más de 3 minutos cada uno en PBT al 0.1%. Los cortes se bloquearon con Tx-100 en albúmina al 1% durante 30 minutos y transcurrido este tiempo se incubaron durante toda la noche, a una temperatura de 4°C con agitación constante, en anticuerpo primario anti SYP hecho en conejo con albúmina (1:1000), exceptuando al control negativo que se conservó en albúmina al 1%. A continuación, todos los cortes se lavaron nuevamente en PBT al 0.1% tres veces por tres minutos cada uno y se colocaron en una solución de albúmina al 1% con PBT durante 30 minutos. Todos los cortes se incubaron durante 90 minutos en anticuerpo secundario (Alexa 568 rojo Goat Anti-rabbit, 1:1000). Posteriormente, se realizaron tres lavados de 3 minutos cada uno con PBT al 0.1% y se colocaron en Hoechst (1:1000) por 10 minutos, una solución de tinción nuclear que emite fluorescencia azul (Figura 9). Por último, los cortes se lavaron cuatro veces (3 minutos cada uno) con PBT al 0.1%.

9.6.1. Montaje

Los cortes se montaron en portaobjetos esmerilados y se dejaron secar a temperatura ambiente. Se utilizó Aqua-Poly/Mount como medio de montaje y se colocaron los cubreobjetos. Se dejaron secar a temperatura ambiente, se limpiaron con alcohol al 70% y finalmente las laminillas se etiquetaron y se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta la toma de las imágenes.

9.7. *Microscopia confocal y obtención de imágenes*

Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal de barrido láser (Zeiss LSM 700, Carl Zeiss, Jena, Alemania) con un objetivo de 10x/0.30 y con el software ZEN 2012 (versión 14.0.13.201, Carl Zeiss). La configuración del láser se mantuvo en 555 nm 2% (rojo) para sinaptofisina y 490 nm 2% (azul) para Hoechst. Se establecieron y aplicaron los mismos parámetros de configuración para todas las imágenes con un Master gain 936 para sinaptofisina. Master gain es uno de los parámetros de detección utilizado para regular la saturación de la imagen. Se utilizó la opción Z-Stack 3 µm y Tile Scan

25x19. Se obtuvieron un total de 80 imágenes por tratamiento y un total final de 240 imágenes. Posteriormente, se delimitaron los ROIs para amígdala, VMH (Figura 5) e HPO (CA1, CA3 y DG) (Figura 5 y 6) con base en el atlas estereotáxico de Paxinos (Paxinos & Watson, 1997) en el software Zen (versión 2.1.57.100, Carl Zeiss) y se analizaron las imágenes para obtener la intensidad volumétrica para sinaptofisina. En el bulbo olfatorio, la configuración del láser se mantuvo en 555 nm 3% (rojo) para SYP y 405 nm 0.2% (azul) para Hoechst. Se establecieron y aplicaron los mismos parámetros de configuración para todas las imágenes con un Master gain 942 para sinaptofisina y de 787 para Hoechst. De igual forma, se utilizó la opción Z-Stack 3 μm y Tile Scan 5x5 para las coordenadas 5.2 mm y 5.7 mm y de 5x8 para las coordenadas 6.2 mm y 6.7 mm.

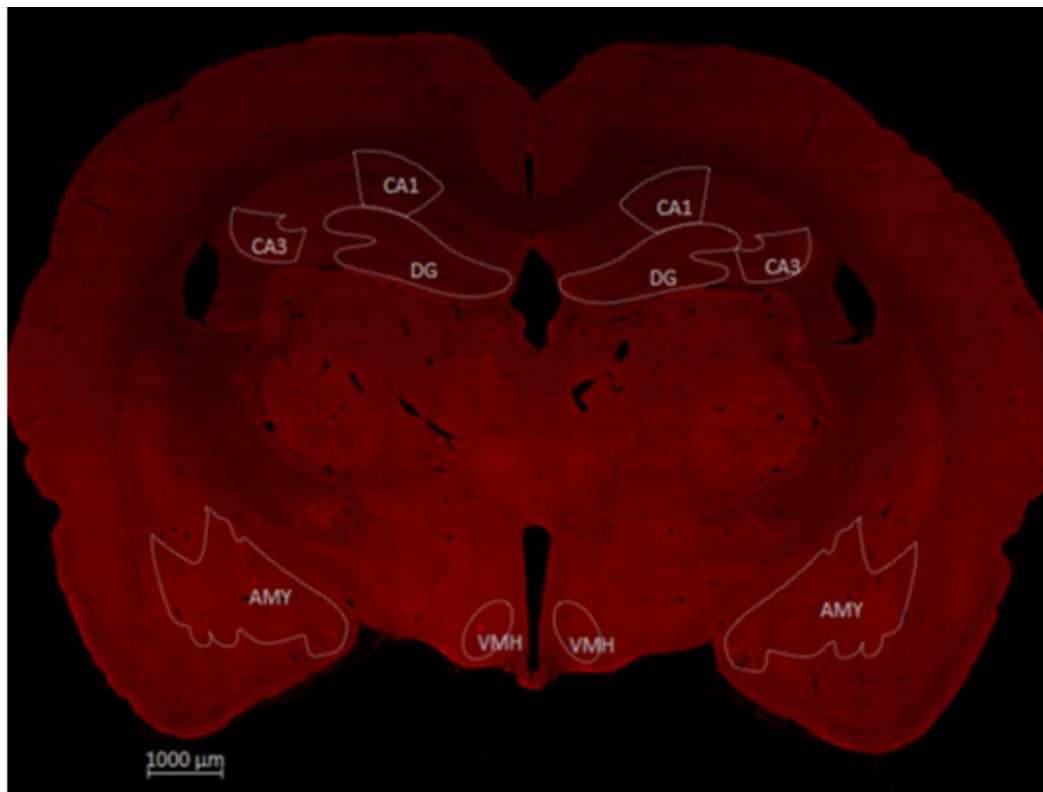


Figura 5. Fotomicrografía confocal de barrido láser de la expresión de SYP en un corte coronal del cerebro de rata macho con la delimitación de los ROIs analizados (CA1, CA3, DG, AMY e VMH). DG: giro dentado; AMY: amígdala; VMH: hipotálamo ventromedial. Barra de escala: 1000 μm .

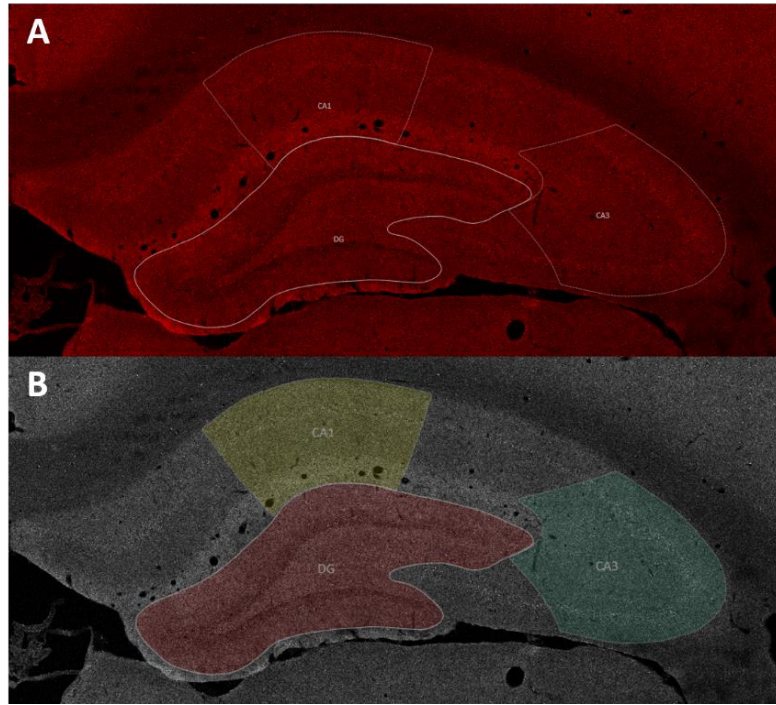


Figura 6. Fotomicrografía confocal de barrido láser que muestra la delimitación de los ROIs analizados en hipocampo. (A y B) Delimitación de CA1, CA3 y DG en hipocampo. (A) Canal rojo (B) Canal LUT grey SYP. Aumento 10x

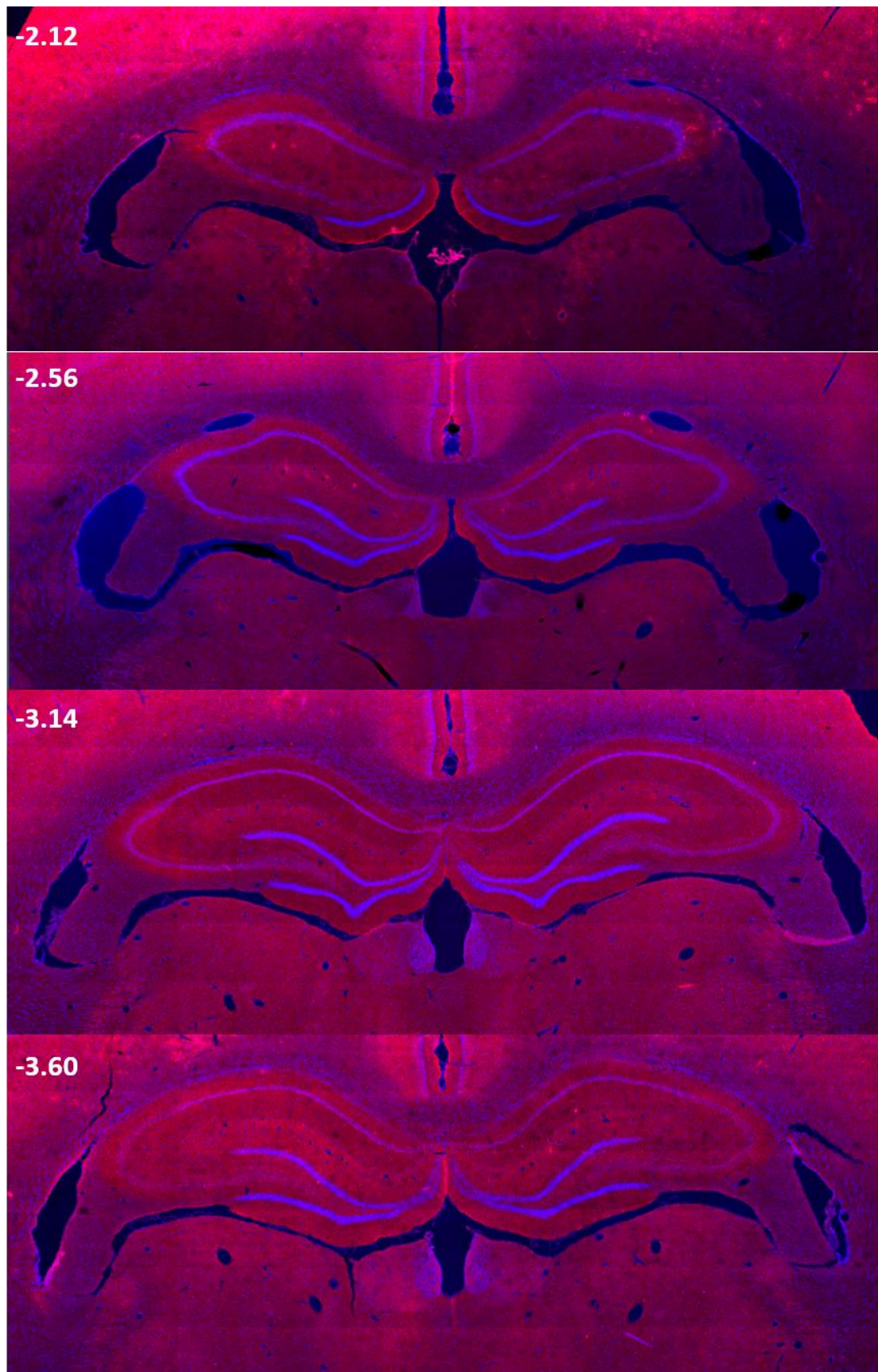


Figura 7. Fotomicrografía confocal de barrido láser del *merge* de la expresión de SYP y Hoechst (marcador de núcleos) que muestra las cuatro coordenadas analizadas en hipocampo: -2.12 mm, -2.56 mm, -3.14 mm y -3.60 mm con respecto a Bregma. Aumento 10x.

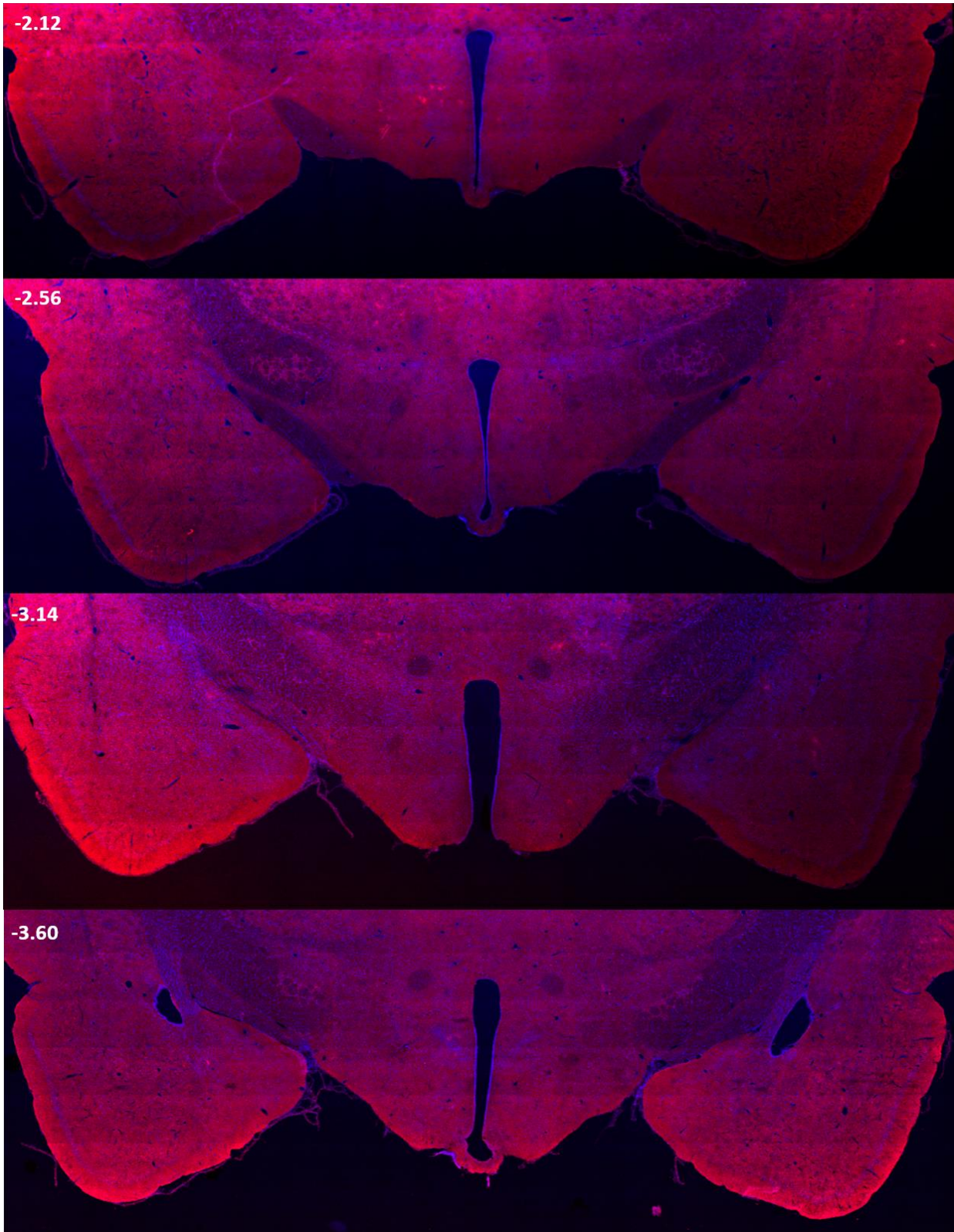


Figura 8. Fotomicrografía confocal de barrido láser del *merge* de la expresión de SYP y Hoechst que muestra las cuatro coordenadas analizadas en amígdala: -2.12 mm, -2.56 mm, -3.14 mm y -3.60 mm. Aumento 10x.

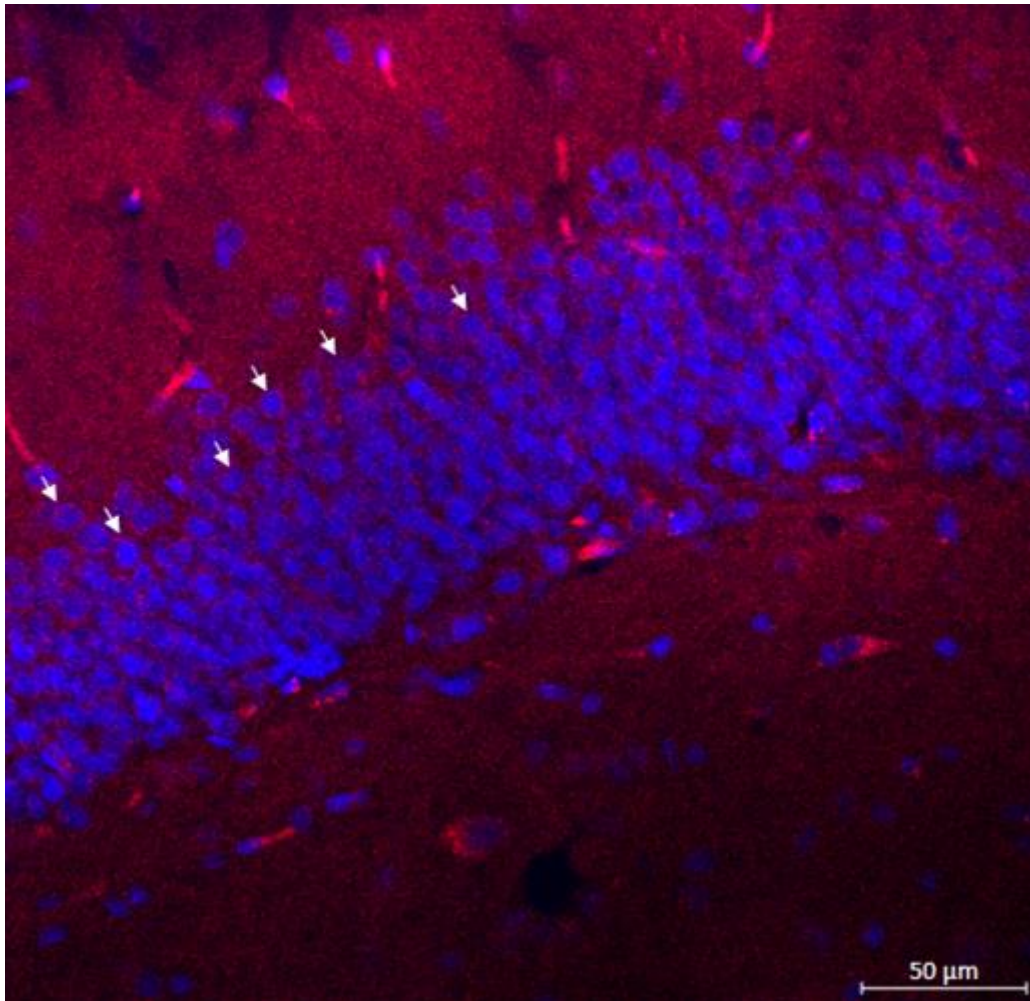


Figura 9. Fotomicrografía confocal de barrido láser del *merge* de la expresión de SYP y Hoechst en el DG del HPO. Las flechas blancas señalan algunos núcleos marcados con Hoechst. Aumento 20x.

9.8. *Estereología*

Se utilizó la herramienta Z-Stack del programa ZEN del microscopio confocal para seleccionar 3 μm en el eje Z en cada corte de cada coordenada (4 cortes por rata, 20 cortes por tratamiento) por lo que analizamos 60 cortes totales para HPO, AMY e VMH y 80 fotografías por grupo. El programa nos arroja 4 imágenes por coordenada obteniendo un total de 240 imágenes (Figura 7 y 8). En bulbo olfatorio se analizaron la misma cantidad de cortes y se obtuvieron, de igual forma, 240 imágenes para analizar. De cada imagen se obtuvo la intensidad volumétrica para SYP de los ROIs: CA1 (exceptuando la coordenada correspondiente al plano -3.14 mm puesto que en ésta no se muestra CA1 tomando como referencia el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1997)),

CA3, DG, AMY, VMH, MOB y AOB, (éste último solamente en las coordenadas 5.7 mm y 6.2 mm ya que en las coordenadas previas tampoco se muestra el ROI AOB en el atlas Paxinos). Al ser áreas bilaterales se realizó el promedio de intensidad volumétrica bilateral para SYP y se obtuvieron 1,140 datos para su posterior análisis estadístico para AMY, VMH e HPO (Figura 10), y para bulbo olfatorio se obtuvieron un total de 480 datos para analizar.

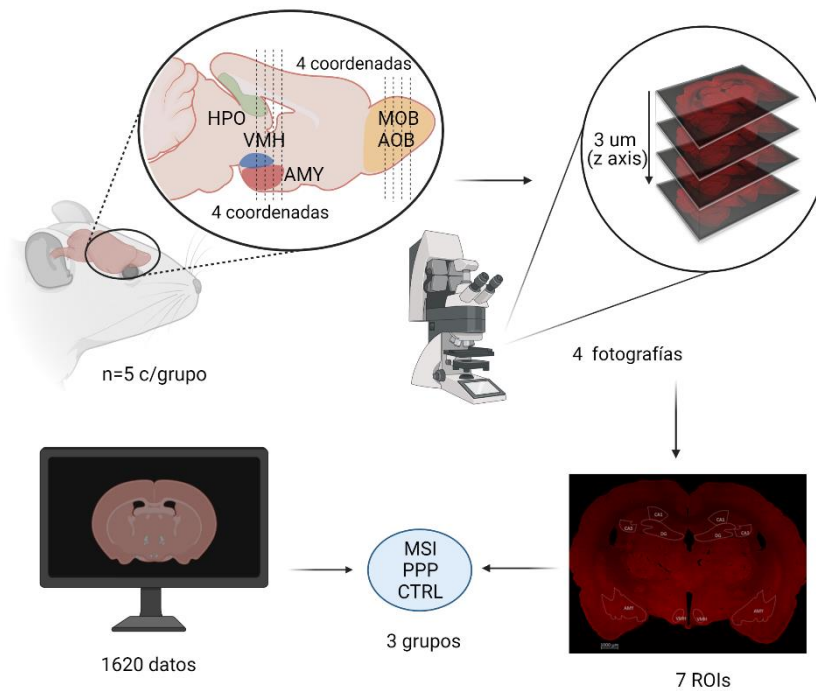


Figura 10. Representación esquemática del número total de fotografías por coordenada y por profundidad (3 µm por corte) para bulbo olfatorio, HPO, AMY e VMH, Creado en: BioRender.com.

9.9. Análisis estadístico

9.9.1. Análisis de conducta sexual en MSI y PPP

La prueba de Shapiro-Wilk arrojó que los parámetros de conducta sexual dentro de cada grupo durante las 10 sesiones (número de montas, número de intromisiones, latencia de montas y latencia de intromisión) no se distribuyeron normalmente, por lo que utilizamos las pruebas de Friedman y Dunn's ($p < 0.05$) como prueba *post-hoc* no paramétricas para analizar los datos. (Tabla 1 y 2).

En la prueba de PPP se contabilizó el tiempo que pasaron los animales experimentales en el compartimento de cada animal estímulo, así como también se registraron los parámetros sexuales. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías (tiempo con cada animal estímulo y sesiones, $p < 0.05$) para medidas repetidas en el factor sesión y una prueba Tukey como prueba *post-hoc* (Figura 11).

En la prueba de MSI, se contabilizó en las semanas 1, 5 y 10 el tiempo que pasaron las ratas experimentales en la zona incentiva de cada animal estímulo mediante un ANOVA de dos vías (tiempo con cada animal estímulo y sesiones) para medidas repetidas en el factor sesión y una prueba Tukey como prueba *post-hoc* (Figura 11). En las semanas intermedias los animales tuvieron sesiones de cópula normal y se registraron los parámetros de conducta sexual los cuales fueron analizados mediante la prueba no paramétrica de Friedman y Dunn's como prueba *post-hoc*. (Tabla 1 y 2).

9.9.2. Análisis de intensidad volumétrica de SYP en PPP y MSI y grupo control.

Bajo la prueba de Shapiro-Wilk ($p < 0.05$) se observó que los datos de intensidad volumétrica para SYP de cada una de las estructuras analizadas (ROIs) no se distribuyeron normalmente, por lo tanto, fueron analizados con la prueba no paramétrica Kruskal Wallis y Dunn's como *post hoc*.

9.9.3. Análisis de intensidad de SYP en los grupos PPP, MSI y control por coordenada.

Se realizó un análisis de la intensidad de SYP por coordenada ya que no hay investigaciones de la actividad neuronal a través del eje antero-posterior.

Con respecto a los datos de intensidad de SYP por grupo y coordenada, la prueba Shapiro Wilk, mostró que los datos no se distribuyeron normalmente, por lo tanto, se realizó un análisis no paramétrico para comparar la intensidad de sinaptofisina entre coordenadas dentro del mismo grupo utilizando la prueba Kruskal Wallis seguida de la prueba Dunn's como prueba *post hoc*.

Por otro lado, para comparar la intensidad de sinaptofisina entre grupos se realizó una prueba de U de Mann-Whitney.

Todo el análisis estadístico fue realizado en el software Sigma Plot versión 11.0.

10. RESULTADOS

10.1. *Parámetros registrados en la conducta sexual*

Los datos de los parámetros registrados en la prueba de MSI se muestran en la Tabla 1. No se observaron diferencias significativas en la latencia de monta, pero si se observa una disminución significativa en la latencia de intromisión ($\bar{\chi}_{(6)}= 18,302$, $p=0.006$) en la sesión 4, 6, 7, 8 y 9 con respecto a la sesión 2. Con respecto al número de montas se observó un aumento significativo ($\bar{\chi}_{(6)}= 15.444$, $p=0.016$) en la sesión 6 con respecto a la sesión 3 y 2. Con respecto al número de intromisiones también se observó un aumento significativo ($\bar{\chi}_{(6)}= 18.302$, $p=0.006$) en la sesión 3, 6, 7, 8 y 9 con respecto a la sesión 2.

Tabla 1. Latencias de monta e intromisión (en segundos) y número de montas e intromisiones en el grupo MSI, en las semanas que copularon cuando no realizaron la prueba de MSI. Los datos representan la media y el error estándar de la media.

Latencia de monta			Latencia de intromisión			No. montas			No. intromisión		
Sesión	Media ± SE	n	Sesión	Media ± SE	n	Sesión	Media ± SE	n	Sesión	Media ± SE	n
2	351 ± 14.7	9	2	622.8 ± 184	8	2	10.8 ± 3.1	10	2	8.6 ± 3.4	10
3	269.88 ± 171	9	3	430.2 ± 168.6	9	3	8.4 ± 2.2	10	3	22 ± 5.8 #	10
4	149.1 ± 38.6	10	4	334 ± 97.8 *	10	4	8.4 ± 2.6	10	4	29 ± 3.2	10
6	97.6 ± 18.9	10	6	397.22 ± 133.38 *	9	6	24.1 ± 4.7 +	10	6	20 ± 5.7 #	9
7	124.5 ± 22.8	10	7	251 ± 74.16 *	10	7	13.8 ± 2.3	10	7	22.3 ± 3.2 #	10
8	180.3 ± 99.8	10	8	358.9 ± 112.89 *	10	8	27.6 ± 8.1	10	8	21.3 ± 4 #	10
9	125.6 ± 44.2	10	9	295.2 ± 75.60 *	10	9	23 ± 4.8	10	9	26.8 ± 5.7 #	10

* Diferente de la sesión 2, $P<0.05$.

+ Diferente de las sesiones 3 y 2, $P<0.05$.

Diferente de la sesión 2, $P<0.05$.

Los datos de los parámetros registrados en la prueba PPP se muestran en la Tabla 2. Se observó una disminución significativa en la latencia de monta ($\bar{\chi}=103.097$ con 14 grados de libertad, $p=0.001$) así como en la latencia de intromisión ($\bar{\chi}= 41.314$ con 9 grados de libertad, $p=0.001$) ambas en las sesiones 3, 5, 9 y 10 con respecto a la sesión 1. De igual forma, se observó un incremento significativo tanto en el número de montas ($\bar{\chi}= 29.605$ con 9 grados de libertad, $p=0.001$) como en el número de intromisiones ($\bar{\chi}= 50.428$ con 9 grados de libertad, $p=0.001$) de la sesión 10 con respecto a la sesión 1.

Tabla 2. Latencias de monta e intromisión (en segundos) y número de montas e intromisiones en el grupo PPP. Los datos representan la media y el error estándar de la media.

Latencia de monta			Latencia de intromisión			No. montas			No. intromisión		
Sesión	Media ± SE	n	Sesión	Media ± SE	n	Sesión	Media ± SE	n	Sesión	Media ± SE	n
1	428.3 ± 180	3	1	398.7 ± 82.4	7	1	0.75 ± 0.3	8	1	6.1 ± 1.4	7
3	90.2 ± 21 *	5	3	158.5 ± 62.8 *	9	3	4.8 ± 1.8	5	3	12.5 ± 2.2	9
5	144 ± 24 *	8	5	129.7 ± 25.4 *	9	5	6.8 ± 1.3	8	5	16.1 ± 1.2	9
7	169.6 ± 41.5	8	7	93.6 ± 21.9	9	7	5.3 ± 1.4	8	7	18.2 ± 2.1	9
9	81.2 ± 27.0 *	6	9	65.3 ± 25.5 *	10	9	2.9 ± 1	6	9	16.8 ± 3.2	10
10	79 ± 31.6 *	10	10	126.1 ± 43.3 *	10	10	7.4 ± 1.8 *	10	10	21.3 ± 1.5 *	10

*Diferente de la sesión 1, $p < 0.05$.

Al analizar el tiempo que las ratas experimentales pasaron en la zona incentivada de la hembra sexualmente receptiva y en la zona del macho sexualmente experto en la prueba de PPP, se observó un aumento significativo ($F_{(1)}=15.811$, $p=0.001$) en la cantidad de tiempo que permaneció el macho en la zona incentivada de la hembra, en la sesión 2 hasta la sesión 10 (Figura 11 A).

Se observa un aumento significativo en el tiempo que permaneció el macho en el compartimento de la hembra ($F_{(1)}=5.317$, $p < 0.001$) en las sesiones 8, 9 y 10 con respecto a la sesión 1 (Figura 11 A). De igual forma, también observamos una disminución significativa en el tiempo que el macho pasa en el compartimento del estímulo macho ($F_{(1)}=5.317$, $p < 0.001$) en las sesiones 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 respecto a la sesión 1 (Figura 11 A). Estos resultados nos reflejan la adquisición de experiencia por parte del macho al aumentar, a través de las sesiones, el tiempo que pasa en el compartimento de la hembra y disminuyendo el tiempo que pasa con el macho desde la segunda sesión (Figura 11 A).

Con respecto a la prueba MSI, al analizar el tiempo que las ratas experimentales pasaron en el compartimento de la hembra estímulo con respecto al del macho estímulo, observamos un aumento significativo en el compartimento de la hembra ($F_{(1)}=27.36$, $p < 0.001$) en la sesión 5 ($q=5.182$, $p=0.001$) y la sesión 10 ($q=6.367$, $p=0.001$) (Figura 11 B) lo que refleja que el macho experimental pasa más tiempo con la hembra que con el macho estímulo a lo largo de las sesiones.

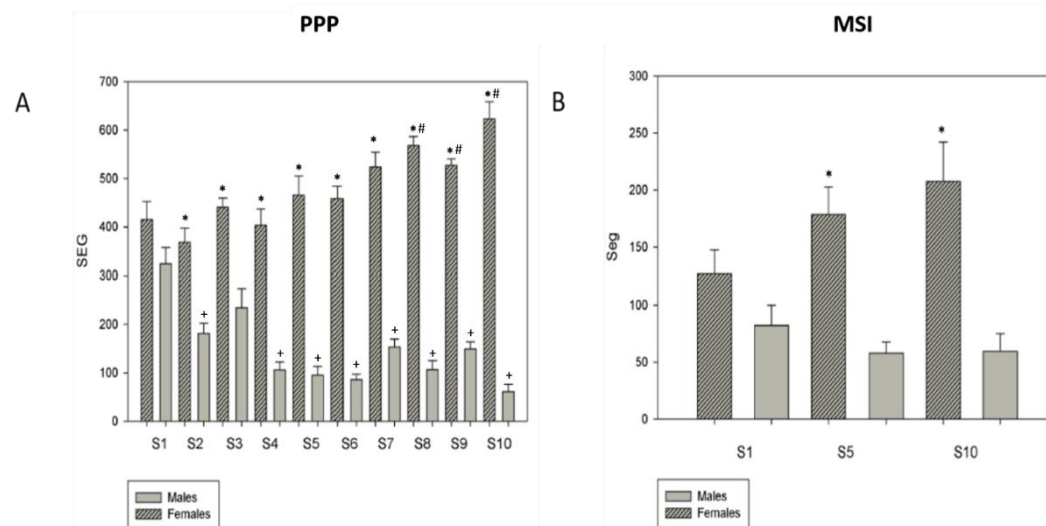


Figura 11. Tiempo en segundos que pasaron las ratas experimentales en los compartimentos de la prueba PPP, durante 10 sesiones (A) y tiempo en segundos que pasaron los sujetos en las zonas incentivadas de la prueba MSI sesiones 1, 5 y 10 (B). Ambos con una n=10. Los datos representan la media y el error estándar de la media. * Diferencia significativa del tiempo que pasa el macho en el compartimento de la hembra con respecto al del macho en la misma sesión, $p < 0.05$. # Diferencia significativa del tiempo que pasa el macho en el compartimento de la hembra con respecto a la sesión 1, $p < 0.05$. + Diferencia significativa del tiempo que pasa el macho en el compartimento del macho estímulo en las sesiones con respecto a la sesión 1, $p < 0.05$.

10.2. Intensidad de SYP

10.2.1. Intensidad volumétrica de SYP para las Prueba de Preferencia de Pareja (PPP), Motivación Sexual Incentiva (MSI) y control.

En el MOB se encontraron diferencias significativas ($p=0.003$) y tras la prueba de Dunn's como prueba *post-hoc* se observan diferencias significativas ($H_{(2)}=8.966$, $Q=2.958$, $p < 0.05$) entre el grupo MSI y el grupo control (Figura 12 A). En AOB, no se observaron diferencias significativas ($p=0.088$) entre ninguno de los grupos (Figura 12 B).

No se observaron diferencias significativas en CA1 ($H_{(2)}=1.054$, $p=0.379$), tampoco en CA3 ($H_{(2)}=1.833$, $p=0.202$) ni en VMH ($H_{(2)}=1.084$, $p=0.369$,) (Figura 13 A, 13 B y 13 E, respectivamente). Sin embargo, en AMY observamos un aumento significativo en la intensidad de SYP ($Q=3.600$, $p=0.038$) entre el grupo MSI con respecto al grupo control (Figura 13 D y 15).

De igual forma, en DG observamos diferencias significativas entre grupos ($H_{(2)}=4.629$, $p=0.032$) por lo que se realizó la prueba *post-hoc* de Dunn's y arrojó

un aumento significativo ($p=0.011$) de la intensidad volumétrica de SYP en el grupo PPP con respecto al grupo control (Figura 13 C y 14).

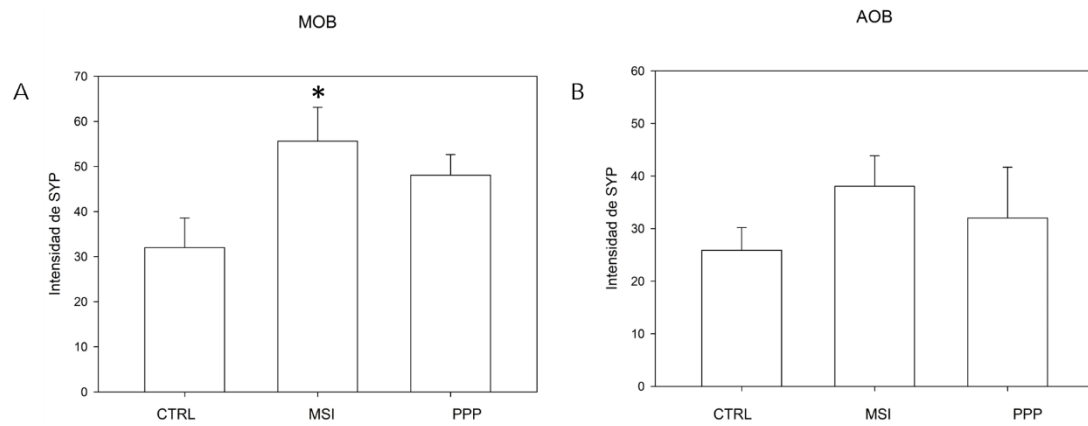


Figura 12. Intensidad de sinaptofisina volumétrica (4 coordenadas) entre los grupos CTRL, MSI y PPP en los 2 ROIs (A) MOB Y (B) AOB de bulfo olfatorio. Los datos representan la media y el error estándar de la media. * Diferencia significativa con respecto al grupo control con una $p<0.05$. CTRL: Control; MSI: Motivación Sexual Incentiva; PPP: Prueba de Preferencia de Pareja; MOB: Bulbo Olfatorio Principal; AOB: Bulbo Olfatorio Accesorio.

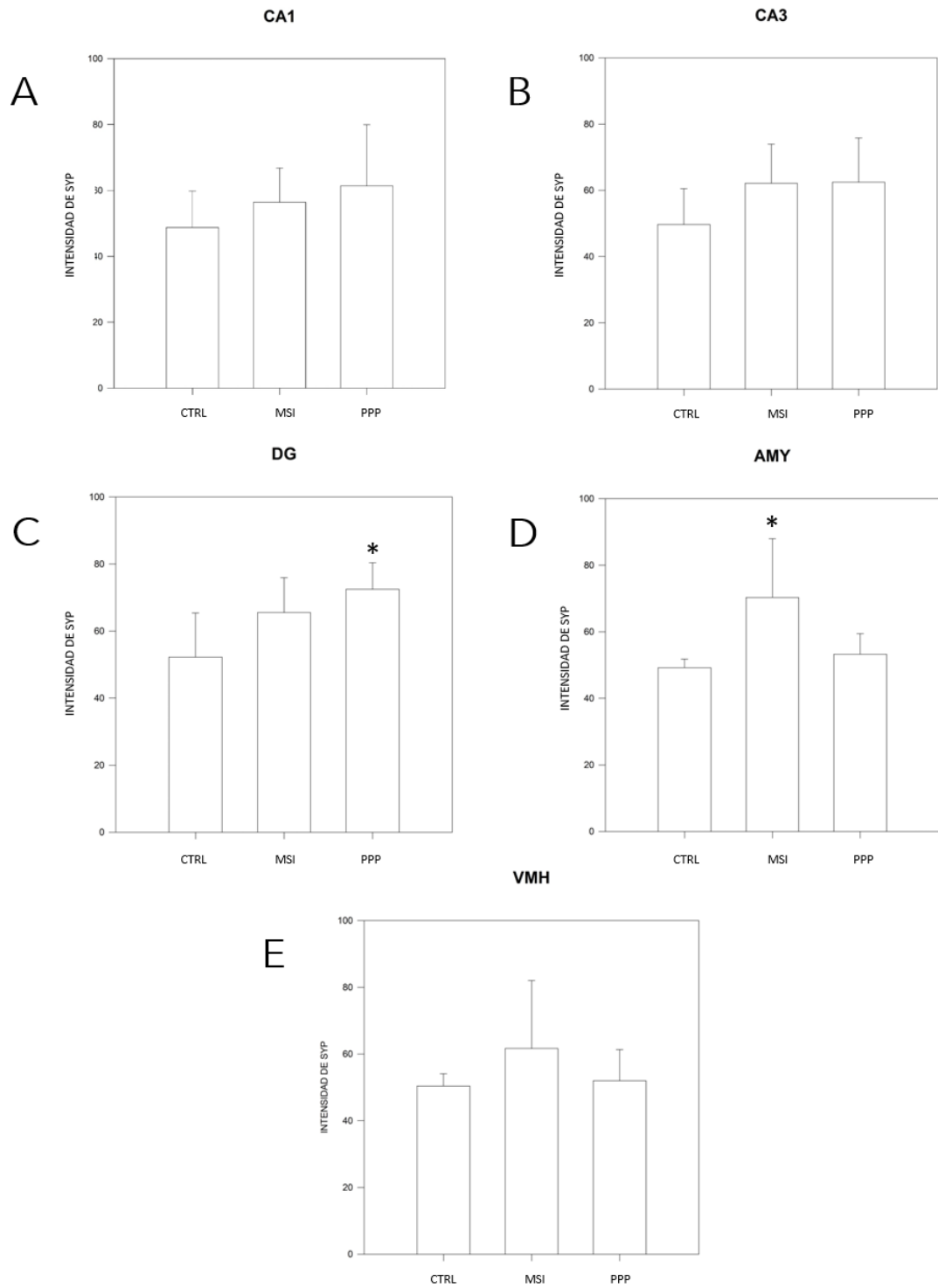


Figura 13. Intensidad de sinaptofisina entre los grupos CTRL, MSI y PPP en (A) CA1 del hipocampo (B) CA3 del hipocampo (C) DG del hipocampo (D) AMY (E) VMH. Los datos representan la media y el error estándar de la media. *Diferencia significativa con respecto al grupo control $p < 0.05$. CTRL: Control; MSI: Motivación Sexual Incentiva; PPP: Prueba de Preferencia de Pareja; DG: Giro dentado; AMY: Amígdala; VMH: Hipotálamo ventromedial.

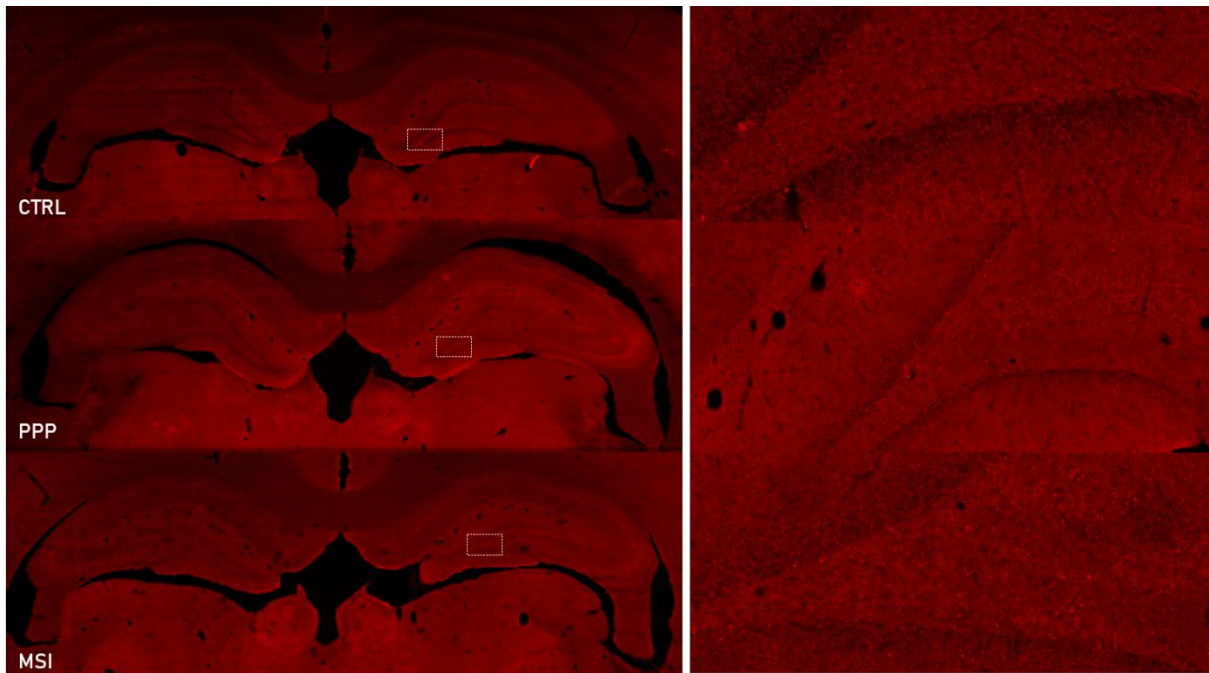


Figura 14. Fotomicrografía confocal de barrido láser de la expresión de sinaptofisina en el hipocampo en los dos grupos experimentales (PPP y MSI) y el grupo control (CTRL) tras la técnica de inmunofluorescencia. Aumento 10x a la izquierda y 20x a la derecha mostrando el DG del HPO. n=5 por grupo. PPP: Prueba de preferencia de pareja. MSI: Motivación sexual incentivada. CTRL: control.

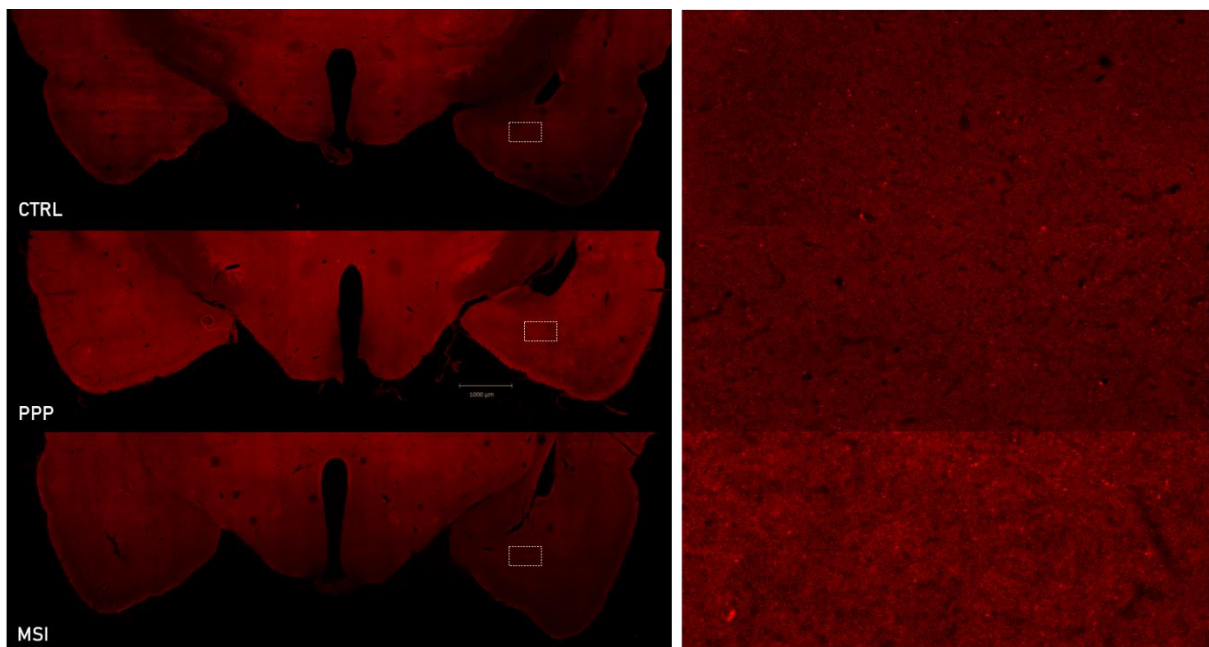


Figura 15. Fotomicrografía confocal de barrido láser de la expresión de sinaptofisina en AMY e VMH en los dos grupos experimentales (PPP y MSI) y en el grupo control (CTRL) tras técnica de inmunofluorescencia. Aumento 10x a la izquierda y 20x a la derecha mostrando AMY. Barra de escala: 1000 μ m. n=5 por grupo. PPP: Prueba de preferencia de pareja. SIM: Motivación sexual incentivada. CTRL: control.

10.2.2. Intensidad de SYP por coordenada para las Prueba de Preferencia de Pareja (PPP), Motivación Sexual Incentiva (MSI) y control.

Se analizó la expresión de sinaptofisina por coordenada de los ROIs MOB y AOB (Figura 19). Las coordenadas fueron 5.12 mm, 5.7 mm, 6.12 mm y 6.7 mm respecto bregma.

Con respecto al análisis intragrupal por coordenada en MOB de PPP se encontraron diferencias significativas ($p < 0.001$) en la coordenada 5.2 mm con respecto a las coordenadas 5.7 mm ($q = 5.417$), 6.2 mm ($q = 4.503$) y 6.7 mm ($q = 4.369$). No se encontraron diferencias significativas en MOB en ninguna coordenada en el grupo control ($p = 0.288$) ni en MSI ($p = 0.685$) (Figura 16 A). Para el AOB no se encontraron diferencias significativas en control ($U = 107.000$, $T = 243.000$, $p = 0.440$), MSI ($U = 199.000$, $T = 411.000$, $p = 0.316$) ni PPP ($U = 131.000$, $T = 479.000$, $p = 0.064$) (Figura 16 B).

El análisis intergrupar de MOB mostró diferencias significativas en la coordenada 5.2 mm ($U = 27.000$, $T = 163.000$, $p < 0.001$), en la coordenada 5.7 mm ($U = 14.000$, $T = 150.000$, $p < 0.001$), en la coordenada 6.2 mm ($U = 10.000$, $T = 146.000$, $p < 0.001$), y la coordenada 6.7 mm ($U = 19.000$, $T = 155.000$, $p < 0.001$) entre el grupo MSI con respecto al grupo control (Figura 16 A). De igual forma, en MOB se encontraron diferencias significativas en la coordenada 5.2 mm ($U = 21.000$, $T = 157.000$, $p < 0.001$), en la coordenada 5.7 mm ($U = 39.000$, $T = 175.000$, $p < 0.001$), la coordenada 6.2 mm ($U = 26.000$, $T = 162.000$, $p < 0.001$) y la coordenada 6.7 mm ($U = 7.000$, $T = 143.000$, $p < 0.001$) en el grupo PPP con respecto al grupo control (Figura 16 A).

Al analizar el grupo MSI con respecto al PPP, se observaron diferencias significativas en la coordenada 5.7 mm ($U = 65.000$, $T = 545.000$, $p < 0.001$), y en la 6.2 mm ($U = 105.00$, $T = 505.000$, $p = 0.011$) (Figura 16 A).

Al analizar el AOB, se encontraron diferencias significativas en el grupo MSI con respecto al grupo control en la coordenada 5.7 mm ($U = 40.000$, $T = 176.000$, $p < 0.001$) y en la coordenada 6.2 mm ($U = 42.000$, $T = 178.000$, $p < 0.001$) (Figura 16 B). En el mismo ROI no se encontraron diferencias significativas entre

el grupo PPP y control en la coordenada 5.7 mm (U=101.000, T=237.000, p=0.062) ni en 6.2 mm (U=156.000, T=300.000, p=0.911). Para AOB entre los grupos experimentales (MSI vs PPP), no hubo diferencias significativas en la coordenada 5.7 mm (U=174.000, T=436.000, p=0.490) pero si en la coordenada 6.2 mm (U=66.000, T=544.000, p=<0.001) (Figura 16 B).

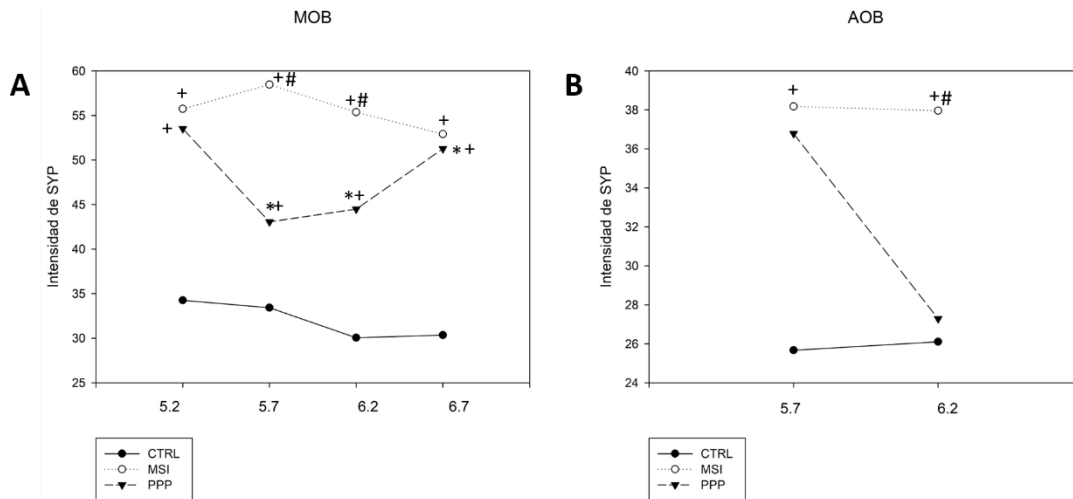


Figura 16. Intensidad de SYP entre los tres grupo (MSI, PPP y CTRL) en los 2 ROIs analizados por coordenada: (A) MOB y (B) AOB. * Representa diferencias significativas entre coordenadas de cada grupo con una p<0.05. +Representan diferencias significativas entre grupo CTRL y grupo experimental, ya sea MSI o PPP con una p<0.05. # Representa diferencias significativas entre los grupos experimentales.

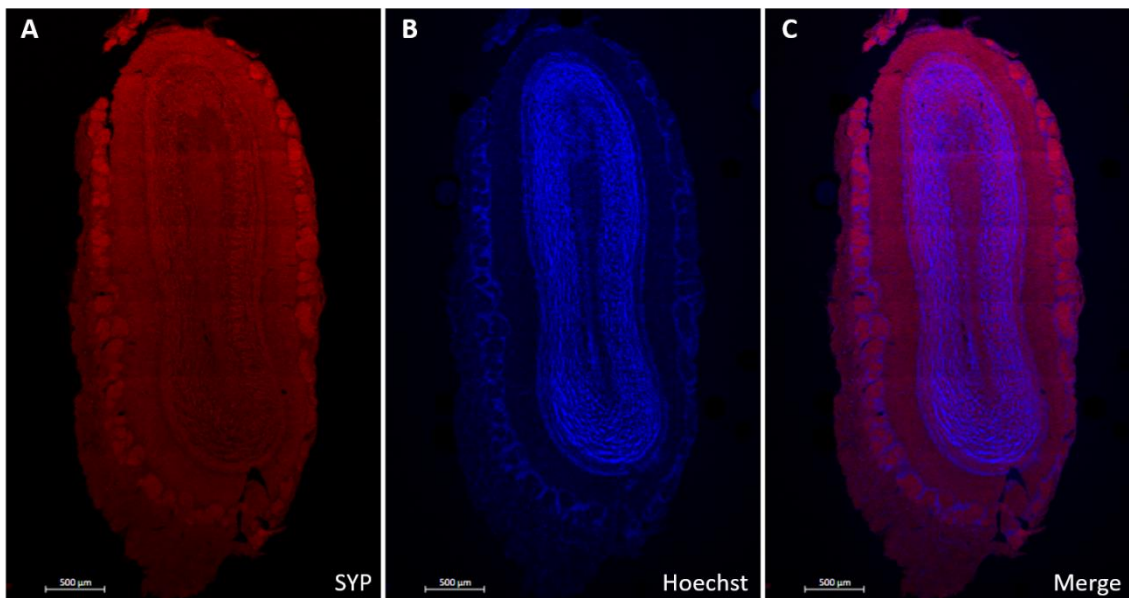


Figura 17. Fotomicrografías confocal de barrido láser que muestra la expresión de de SYP (A), la expresión de Hoechst, marcador nuclear que emite fluorescencia azul (B) y *merge* de A y B (C) en el bulbo olfatorio coordenada 6.7 mm respecto Bregma. Barra de escala: 500 μm. Aumento 10x.

De igual forma, analizamos la expresión de sinaptofisina por coordenada de los ROIs GD, CA1, CA3 (Figura 7), AMY y VMH (Figura 8). Las coordenadas fueron -2.12 mm, -2.56 mm, -3.14 mm y -3.60 mm respecto bregma.

De forma intragrupal, con respecto al VMH, se observaron diferencias significativas ($p=0.001$) en el grupo CTRL en las coordenadas -2.12 mm con respecto a la -3.14 mm (Figura 18 E) y en el grupo MSI observamos diferencias significativas ($p=0.001$) entre la coordenada -2.12 mm con -2.56 mm, -3.14 mm y -3.60 mm (Figura 18 E).

Con respecto a la AMY se observaron diferencias significativas ($p=0.001$) entre las coordenadas -2.12 mm vs -2.56 mm, -2.12 mm vs -3.14 mm y -3.14 mm vs -3.60 mm en el grupo CTRL (Figura 18 D). En el MSI observamos diferencias significativas ($p=0.001$) en AMY en la coordenada -2.12 mm con respecto a las coordenadas -2.56 mm, -3.14 mm y -3.60 mm (Figura 18 D). De igual forma, hubo diferencias significativas en AMY en la prueba PPP ($p=0.001$) entre las coordenadas -2.12 mm vs -2.56 mm, -3.14 mm vs -2.56 mm y -3.60 mm (Figura 18 D).

Con respecto a los ROIs de HPO, no se encontraron diferencias significativas en CA1 y CA3 en ninguna coordenada. En DG en la prueba PPP se encontraron diferencias significativas ($p=0.009$) en la coordenada -2.12 mm con respecto a las coordenadas -2.56 mm, -3.14 mm y -3.60 mm (Figura 18 C).

Analizamos los datos entre grupos. En este análisis, con respecto al VMH, en la coordenada -2.12 mm observamos diferencias significativas entre los grupos experimentales ($U=92.000$, $T=365.000$, $p=0.032$). En la coordenada -2.56 mm también observamos diferencias significativas entre los experimentales ($U=55.000$, $T=401.000$, $p<0.001$). Con respecto a la coordenada -3.14 mm se observaron diferencias entre el grupo control vs MSI ($U=84.000$, $T=194.000$, $p=0.002$) y entre control y PPP ($U=66.000$, $T=276.000$, $p<0.001$) y por último, en la misma coordenada pero entre los grupos experimentales ($U=95.000$, $T=305.000$, $p=0.005$) (Figura 18 E).

Con respecto a la AMY el análisis entre grupos, se encontraron diferencias significativas ($U=82.000$, $T=374.000$, $p=0.014$) entre los grupos experimentales (MSI y PPP) en la coordenada -2.12 mm (Figura 18 D). En la coordenada -2.56

mm de ese mismo ROI hubo diferencias significativas entre los grupos experimentales ($U=32.000$, $T=424.000$, $p<0.001$) y entre el grupo control y MSI ($U=96.000$, $T=360.000$, $p=0.043$) (Figura 18 D). En la coordenada -3.14 mm observamos diferencias significativas ($U=74.000$, $T=284.000$, $p<0.001$) entre el grupo control vs MSI y al PPP ($U=43.000$, $T=253.000$, $p<0.001$) y entre MSI y PPP ($U=87.000$, $T=297.000$, $p=0.002$) (Figura 18 D). Al analizar la coordenada -3.60 mm en AMY se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales ($U=104.000$, $T=506.000$, $p=0.010$) (Figura 18 D).

No se encontraron diferencias significativas en CA1 del HPO. Sin embargo, hubo diferencias significativas en CA3 ($U=82.000$, $T=218.000$, $p=0.014$) y en DG ($U=63.000$, $T=199.000$, $p=0.002$) en el grupo PPP con respecto al grupo control en la coordenada -2.12 mm. En la misma coordenada en DG también se encontraron diferencias significativas ($U=53.000$, $T=131.000$, $p=0.010$) entre MSI y PPP.

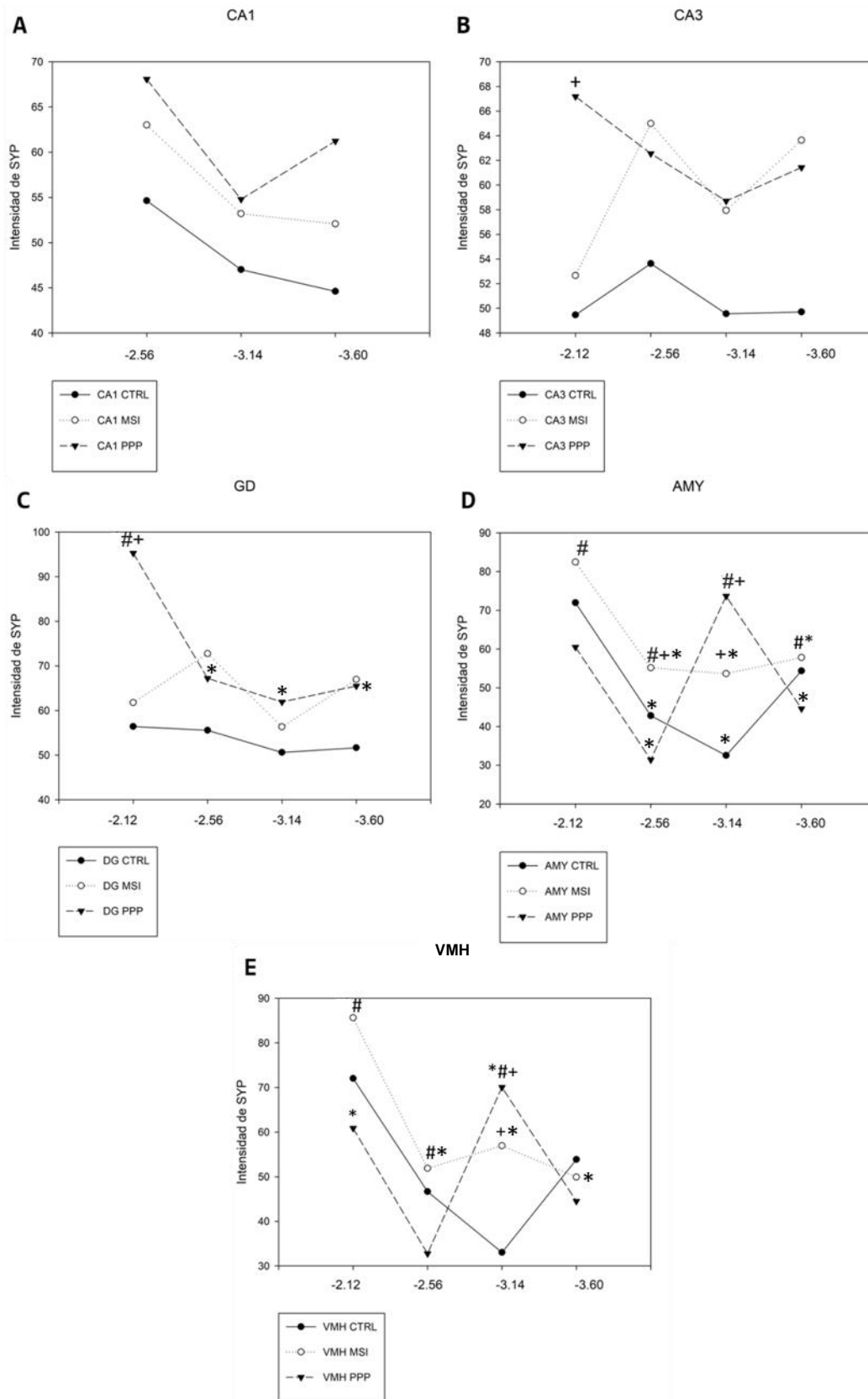


Figura 18. Intensidad de SYP entre los tres grupo (MSI, PPP y CTRL) en los 5 ROIs analizados por coordenada: hipocampo (A) CA1, (B) CA3, (C) DG, (D) AMY y (E) VMH. * Representa diferencias significativas entre coordenadas de cada grupo con una $p < 0.05$. + Representa diferencias significativas entre grupo CTRL y grupo experimental, ya sea MSI o PPP con una $p < 0.05$. # Representa diferencias significativas entre los grupos experimentales.

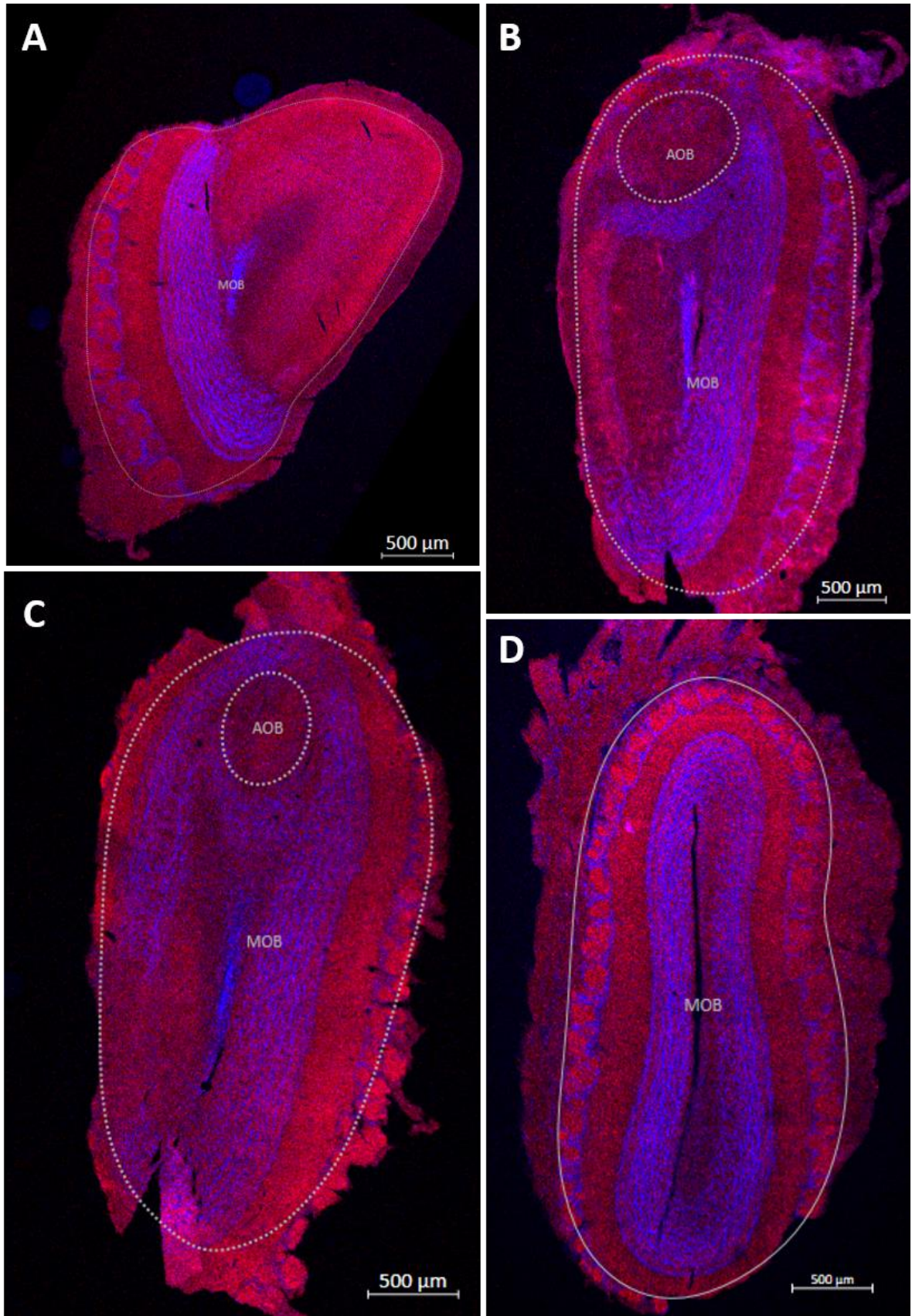


Figura 19. Fotomicrografía del merge de la expresión de SYP y Hoechst. Se muestran los ROIs de MOB y AOB para las cuatro coordenadas analizadas (A) 5.12 mm (B) 5.70 mm (C) 6.12 mm y (D) 6.7 mm. Barra de escala: 500 μm . Aumento 10x.

11. DISCUSIÓN

Esta investigación demostró a través de la expresión de SYP, plasticidad neuronal en algunas estructuras cerebrales que modulan la conducta sexual.

Sugerimos que el aumento de la intensidad de SYP en DG en la prueba de preferencia de pareja (PPP) con respecto al grupo control fue debido a que el DG es un sitio de neurogénesis, proceso a partir del cual se provoca una mejora en el funcionamiento del cerebro y se aumentan los comportamientos adaptativos como la conducta sexual. De hecho, la neurogénesis es considerado como un mecanismo adaptativo neurobiológico (Leal-Galicia *et al.*, 2019). El estrés es uno de los principales causantes de la inhibición neurogénica hipocampal. Diversos estudios (Kim *et al.*, 2013) han reportado que la actividad sexual genera cierta neuroprotección ante el estrés crónico, protegiendo así, la neurogénesis hipocampal. Leuner y colaboradores (2010) han reportado que una sola interacción sexual puede incrementar la proliferación hipocampal y que 14 días consecutivos de 30 minutos de interacción sexual generan un incremento significativo de neurogénesis hipocampal así como también un incremento en la densidad y la longitud de espinas dendríticas.

El hipocampo tiene estrecha relación con el tabique, los cuerpos mamilares, el hipotálamo y la amígdala, por lo que cualquier estimulación de estas regiones estimula también al hipocampo (Fogwe *et al.*, 2021). Al hipocampo se le confieren funciones de toma de decisiones, almacenamiento de información y en animales inferiores la de responder a invitaciones sexuales por la detección de feromonas, discriminación olfativa, entre otros (Fogwe *et al.*, 2021). De igual forma, se sabe que el hipocampo es una estructura relacionada fuertemente con funciones de aprendizaje y memoria. Como se mencionó anteriormente, en ambientes cambiantes y complejos, como los ambientes naturales, los animales deben ir en busca de una pareja sexual potencial ya que a pesar de que la conducta sexual no es considerada como una conducta motivada primaria como lo es comer o beber, es indispensable para la supervivencia de la especie. Para lograr esto, se sugiere que se necesita una mayor capacidad de aprendizaje, mejores habilidades y mejor memoria visuoespacial (Leal-Galicia *et al.*, 2019).

La neurogénesis adulta hipocampal es un fenómeno de plasticidad sináptica tanto funcional como estructural. En esta investigación, el aumento de SYP lo relacionamos con un cambio estructural (nacimiento de nuevos contactos sinápticos) ya que la SYP se ha asociado como marcador confiable que puede utilizarse para determinar la distribución y densidad de sinapsis nuevas y funcionales (Glantz *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010; Tata *et al.*, 2021). Sin embargo, esto es únicamente una inferencia debido a que actualmente no se sabe si las nuevas sinapsis observadas y este cambio estructural, reflejadas con el aumento de la intensidad de SYP, trae consecuencias funcionales o no. Hace falta el desarrollo de técnicas que nos permitan dilucidar este último punto. Gracias a circuitos neuronales preexistentes y a la conectividad sináptica que el giro dentado tiene con áreas como la corteza entorrinal, se puede llegar a la integración de nuevas neuronas con la participación de factores como neurotransmisores que promueven y modulan su supervivencia. Así pues, la neurogénesis contribuye a la plasticidad de circuitos ya existentes (Toda & Gage, 2018).

Se sabe que la neurogénesis adulta hipocampal depende de factores como la experiencia. Consideramos que, en el presente trabajo, la experiencia sexual adquirida contribuyó a los cambios plásticos observados por el aumento de SYP en los grupos experimentales con respecto al grupo control, el cual no estuvo expuesto a la experiencia sexual por lo que podemos sugerir que la neurogénesis hipocampal que observamos en este estudio mejoró el rendimiento sexual en individuos con experiencia sexual. Se sabe que la plasticidad neuronal trata de disminuir los efectos de algunas lesiones produciendo la reorganización sináptica estructural y/o funcional, por ejemplo, Aguilar-Arredondo y colaboradores (2017) indujeron daño neurotóxico en el hipocampo de ratas, específicamente en el DG, con la infusión de ácido kaínico y observaron un aumento de las proteínas SYP y Arc (*Activity-Regulated Cytoskeleton-associated protein*, por sus siglas en inglés), así como un aumento en la actividad neuronal de los animales dañados tras inducir una tarea de exploración espacial como experiencia conductual. Este tipo de estudios apoyan nuestros resultados, ya que observamos un aumento de SYP en el DG inducido por la experiencia sexual.

Con respecto al aumento de SYP observado en la AMY en el grupo MSI con respecto al grupo control, creemos que es debido a que este es un sitio de asociación de información dado que recibe proyecciones de todas las modalidades sensoriales y es una de las regiones más relacionadas con aspectos motivacionales y aspectos gratificantes (O'Connell & Hofmann, 2011). De igual forma, se le atribuye la capacidad de formar asociaciones entre las entradas sensoriales actuales y la experiencia previa (Sah *et al.*, 2003), por lo que la experiencia sexual adquirida durante 10 semanas se puede asociar con este incremento observado. Esto nos sugiere que la participación de la amígdala dentro de estos circuitos neuronales involucrados en la conducta sexual, es fundamental en la fase motivacional la cual hace referencia a la etapa pre-copulatoria donde se expresan conductas de acercamiento y aproximación hacia el estímulo con propiedades gratificantes (en este caso, una hembra sexualmente receptiva), sin la cual la ejecución sexual no se llevaría a cabo.

De igual forma, la importancia de la amígdala en la etapa motivacional se ve reflejada en el hecho de que esta región presenta conexiones directas con el bulbo olfatorio ayudando a procesar señales olfativas sexualmente relevantes como la orina u otros olores del conoespecífico. Se sabe que el órgano vomeronasal (VNO) coordina señales químicas (feromonas) importantes para los comportamientos de acercamiento y que tiene aferencias directas hacia el bulbo olfatorio accesorio (AOB), por lo que la pérdida de su función limita la plasticidad conductal en los patrones de comportamiento y, por tanto, se altera el comportamiento sexual (Kikusui *et al.*, 2018).

Diversos estudios han tratado de dilucidar las vías de señalización dependientes del sexo utilizando señales olfativas sexualmente relevantes como la orina. Así, se identificó en ratones machos, un patrón de activación dependientes del sexo que va desde el AOB a la amígdala medial postero-dorsal (MePD) que transmite mayoritariamente información sexualmente relevante de la hembra (Kikusui *et al.*, 2018). En este estudio se observó que el número de neuronas positivas que responden a la orina femenina en la MePD fue significativamente mayor que las que respondieron a la orina masculina tanto en el MePD como en la amígdala medial posteroventral (MePV, por sus siglas en inglés), es decir, la orina femenina activó la MePD en los ratones macho

induciendo comportamientos de montas opuesto a lo ocurrido con la orina masculina que produjo activación del MePV en las hembras (Kikusui *et al.*, 2018).

Otro aspecto importante es que, la amígdala a su vez, envía proyecciones a varios núcleos del hipotálamo como el VMH y la BNST, los cuales participan en el control del comportamiento sexual y otras formas de comportamientos sociales (Yang & Shah, 2016). Por esta razón, se considera a la amígdala como región fundamental en las primeras etapas del comportamiento sexual (etapa pre-copulatoria), siendo una estructura de relevo de información proveniente de estímulos sexualmente relevantes y de diversos comportamientos sociales, lo cual observamos en este trabajo.

Nuestros resultados muestran una mayor intensidad de SYP en el MOB para el grupo MSI con respecto al grupo control, lo que concuerda con estudios en los cuales se ha observado que lesiones o la remoción bilateral de los bulbos olfatorios producen déficits en el comportamiento sexual en ratas macho (Edwards *et al.*, 1990; Kirkpatrick *et al.*, 1994). Los bulbos olfatorios tienen una influencia clara en la conducta sexual en roedores ya que este comportamiento depende de la detección adecuada de estímulos del conoespecífico. Estos, junto con el giro dentado, son dos de los tres nichos neurogénicos actualmente conocidos que permiten cierta flexibilidad y adaptabilidad en los circuitos neuronales dependiendo del procesamiento diferencial de ciertos estímulos.

Al discutir por qué en el grupo PPP no hubo diferencias significativas en la AMY, pero sí en DG, aun sabiendo que se están evaluando las dos etapas de la conducta sexual, especulamos que es debido a que al evaluar únicamente la motivación se ve un aumento en aquellas estructuras más relacionadas con esa etapa (como la AMY). Sin embargo, cuando se evalúa la ejecución sexual, que lleva aunada a la motivación que es indispensable para la ejecución, entonces la motivación se ve “opacada” por la sumatoria de las dos etapas y no se ve reflejado este aumento del grupo PPP con respecto al grupo MSI, pero sí del grupo PPP con el grupo control.

Las investigaciones de la actividad neuronal a través del eje antero-posterior en estas regiones cerebrales son nulas tanto en roedores como en humanos. Es por ello que, en el presente trabajo, se quiso abrir paso al estudio de estas estructuras y dilucidar si hay diferencias en la expresión de SYP a través del eje

antero-posterior. Como puede apreciarse en nuestros resultados, hay patrones muy diferentes en la intensidad de SYP observada por coordenadas. En la mayoría de los casos (no en todos los grupos ni en todas las regiones analizadas), se ha observado que, en regiones anteriores (o rostrales), esto es coordenadas -2.12 mm y -2.56 mm, hay mayor intensidad de SYP. Esta mayor distribución de SYP en regiones anteriores podría deberse a que en estas coordenadas se recibe información del conoespecífico de forma más directa para comenzar su procesamiento.

Por último, una de las limitantes observadas en el presente trabajo se centra principalmente en la imposibilidad de evaluar de manera única y separada la fase de ejecución sexual, ya que, como lo mencionamos anteriormente, la motivación sexual es indispensable para que se despliegue la cópula como tal.

Con el objetivo de dar seguimiento a las demás estructuras que conforman el circuito de recompensa sexual, a la fecha, estamos evaluando la intensidad de SYP en estructuras cerebrales como el NAcc, la BNST y el MPOA. De igual forma, al determinar si existen cambios plásticos en estas estructuras cerebrales debido a la conducta y la experiencia sexual, nos permitirá sugerir o implementar futuras investigaciones en campos como la fisiología y la morfología, identificando, por ejemplo, mecanismos sobre la liberación hormonal y la neurotransmisión que se relacionen con cambios en la organización cerebral que incluyan el número o el volumen neuronal inducidos por la conducta sexual.

12. CONCLUSIONES

El presente estudio muestra evidencia de que la ejecución sexual, evaluada a través de la Prueba de Preferencia de Pareja (PPP) indujo un incremento en la expresión de SYP en el giro dentado del hipocampo mientras que la motivación sexual, evaluada a través de la Motivación Sexual Incentiva (MSI) indujo también un incremento de SYP, pero en la amígdala (AMY) y en el MOB. De manera general, la conducta sexual como conducta motivada, induce cambios plásticos en estructuras cerebrales pertenecientes al circuito de recompensa sexual. Los cambios observados en estas estructuras son evidencia de que son núcleos clave dentro de los circuitos que controlan las respuestas sexuales.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Ågmo, A. (1999). Sexual motivation - An inquiry into events determining the occurrence of sexual behavior. *Behavioural Brain Research*, 105(1), 129–150. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(99\)00088-1](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(99)00088-1)
- Ågmo, A. (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>
- Aguilar-Arredondo, A., López-Hernández, F., García-Velázquez, L., Arias, C., & Zepeda, A. (2017). Behavior-associated Neuronal Activation After Kainic Acid-induced Hippocampal Neurotoxicity is Modulated in Time. *Anatomical Record*, 300(2), 425–432. <https://doi.org/10.1002/ar.23513>
- Aizawa, S., & Yamamuro, Y. (2020). Possible involvement of DNA methylation in hippocampal synaptophysin gene expression during postnatal development of mice: DNA methylation regulates Syp expression. *Neurochemistry International*, 132, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.104587>
- Alcaro, A., Huber, R., & Panksepp, J. (2007). Behavioral functions of the mesolimbic dopaminergic system: An affective neuroethological perspective. *Brain Research Reviews*, 56(2), 283–321. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.07.014>
- Arthur, C. P., & Stowell, M. H. B. (2007). Structure of Synaptophysin: A Hexameric MARVEL-Domain Channel Protein. *Structure*, 15(6), 707–714. <https://doi.org/10.1016/j.str.2007.04.011>

- Beach, F. A. (1976). Sexual Attractivity, Proceptivity, and Receptivity in Female Mammals. *Hormones and Behavior*, 7, 105–138.
- Beck, J., Bialy, M., & Kostowski, W. (2002). Effects of D1 receptor agonist SKF 38393 on male rat sexual behavior and postcopulatory departure in the goal compartment-runway paradigm. *Physiology and Behavior*, 76(1), 91–97. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(02\)00678-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(02)00678-9)
- Bedos, M., Portillo, W., & Paredes, R. G. (2018). Neurogenesis and sexual behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 51(February), 68–79. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2018.02.004>
- Berridge, K. C., & Kringelbach, M. L. (2015). Pleasure Systems of the Brain. *Neuron*, 86(3), 646–664. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.02.018>.Pleasure
- Boling, J. L., & Blandau, R. J. (1939). The estrogen-progesterone induction of mating responses in the spayed female rat. *Endocrinology*, 25(3), 359–364. <https://doi.org/10.1210/endo-25-3-359>
- Bustos, M. (2008). Núcleo accumbens y el sistema motivacional a cargo del apego. *Revista Chilena de Neuro-Psiquiatría*, 46(3), 207–215. <https://doi.org/10.4067/s0717-92272008000300006>
- Chang, C.-W., Hsiao, Y.-T., & Jackson, M. B. (2021). Synaptophysin Regulates Fusion Pores and Exocytosis Mode in Chromaffin Cells. *The Journal of Neuroscience*, 41(16), 3563–3578. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2833-20.2021>
- 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>
- Cooke, B. M., Breedlove, S. M., & Jordan, C. L. (2003). Both estrogen receptors and androgen receptors contribute to testosterone-induced changes in the morphology of the medial amygdala and sexual arousal in male rats. *Hormones and Behavior*, 43(2), 336–346. <https://doi.org/10.1016/S0018->

- Coolen, L. M., Peters, H. J. P. W., & Veening, J. G. (1998). Anatomical interrelationships of the medial preoptic area and other brain regions activated following male sexual behavior: A combined Fos and tract-tracing study. *Journal of Comparative Neurology*, 397(3), 421–435. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19980803\)397:3<421::AID-CNE8>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19980803)397:3<421::AID-CNE8>3.0.CO;2-4)
- Cotman, C. W., Berchtold, N. C., & Christie, L. A. (2007). Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends in Neurosciences*, 30(9), 464–472. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.06.011>
- Davies, H. A., Kelly, A., Dhanrajan, T. M., Lynch, M. A., Rodríguez, J. J., & Stewart, M. G. (2003). Synaptophysin immunogold labelling of synapses decreases in dentate gyrus of the hippocampus of aged rats. *Brain Research*, 986(1–2), 191–195. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)03251-7](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)03251-7)
- DiCarlo, G. E., Aguilar, J. I., Matthies, H. J. G., Harrison, F. E., Bundschuh, K. E., West, A., Hashemi, P., Herborg, F., Rickhag, M., Chen, H., Gether, U., Wallace, M. T., & Galli, A. (2019). Autism-linked dopamine transporter mutation alters striatal dopamine neurotransmission and dopamine-dependent behaviors. *Journal of Clinical Investigation*, 129(8), 3407–3419. <https://doi.org/10.1172/JCI127411>
- Dorantes, M. de los Á. (2019). *Tesis de Doctorado. Papel del cuidado materno en la conducta sexual masculina en ratas de alto y bajo bostezo y Sprague-Dawley*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Instituto de Fisiología.
- Edwards, D. A., Griffis, K. T., & Tardivel, C. (1990). Olfactory bulb removal: Effects on sexual behavior and partner-preference in male rats. *Physiology and Behavior*, 48(3), 447–450. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(90\)90342-2](https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90342-2)
- Elibol-Can, B., Kilic, E., Yuruker, S., & Jakubowska-Dogru, E. (2014). Investigation into the effects of prenatal alcohol exposure on postnatal spine

- development and expression of synaptophysin and PSD95 in rat hippocampus. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 33(1), 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2013.12.003>
- Evans, G. J. O., & Cousin, M. A. (2005). Tyrosine phosphorylation of synaptophysin in synaptic vesicle recycling. *Biochemical Society Transactions*, 33, 1350–1353.
- Eyers, C. E. (2020). *Histidine Phosphorylation. Methods and Protocols* (C. E. Eyers (ed.); 1st ed.). Humana Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9884-5>
- Fogwe, L. A., Reddy, V., & Mesfin, F. B. (2021). *Neuroanatomy , Hippocampus Blood Supply and Lymphatics Continuing Education / Review Questions*. 1–6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482171/?report=printable>
- García-Segura, L. M., Chowen, J. A., Párducz, A., & Naftolin, F. (1994). Gonadal hormones as promoters of structural synaptic plasticity: Cellular mechanisms. *Progress in Neurobiology*, 44(3), 279–307. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(94\)90042-6](https://doi.org/10.1016/0301-0082(94)90042-6)
- Geyer, L. A., & Barfield, R. J. (1978). Influence of gonadal hormones and sexual behavior on ultrasonic vocalization in rats: I. Treatment of females. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 92(3), 438–446. <https://doi.org/10.1037/h0077480>
- Gincel, D., & Shoshan-Barmatz, V. (2002). The Synaptic Vesicle Protein Synaptophysin: Purification and Characterization of Its Channel Activity. *Biophysical Journal*, 83, 3223–3229.
- Giuliano, F., & Allard, J. (2001). Dopamine and male sexual function. *European Urology*, 40(6), 601–608. <https://doi.org/10.1159/000049844>
- Glantz, L. A., Gilmore, J. H., Hamer, R. M., Lieberman, J. A., & Jarskog, L. F. (2007). Synaptophysin and postsynaptic density protein 95 in the human prefrontal cortex from mid-gestation into early adulthood. *Neuroscience*, 149(3), 582–591. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.06.036>
- Glasper, E. R., & Gould, E. (2013). Sexual experience restores age-related

decline in adult neurogenesis and hippocampal function. *Hippocampus*, 23(4), 303–312. <https://doi.org/10.1002/hipo.22090>

González Flores, Ó., García Juárez, M., Domínguez Ordóñez, R., & Beyer, C. (2015). Las hormonas y la conducta sexual femenina. *Ciencia*, 24–29. https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/66_4/PDF/HormonasFemenina.pdf

Gordon, S. L., & Cousin, M. A. (2014). The sybtraps: Control of synaptobrevin traffic by synaptophysin, α -synuclein and AP-180. *Traffic*, 15(3), 245–254. <https://doi.org/10.1111/tra.12140>

Grijalva, L. E., Miranda, M. I., & Paredes, R. G. (2021). Differential changes in GAP-43 or synaptophysin during appetitive and aversive taste memory formation. *Behavioural Brain Research*, 397(March 2020), 112937. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112937>

Guadarrama-Bazante, I. L., & Rodríguez-Manzo, G. (2019). Nucleus accumbens dopamine increases sexual motivation in sexually satiated male rats. *Psychopharmacology*, 236(4), 1303–1312. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5142-y>

Hami, J., Vafaei-Nezhad, S., Ivar, G., Sadeghi, A., Ghaemi, K., Mostafavizadeh, M., & Hosseini, M. (2016). Altered expression and localization of synaptophysin in developing cerebellar cortex of neonatal rats due to maternal diabetes mellitus. *Metabolic Brain Disease*, 31(6), 1369–1380. <https://doi.org/10.1007/s11011-016-9864-4>

Hellier, V., Brock, O., & Bakker, J. (2019). The role of kisspeptin in sexual behavior. *Seminars in Reproductive Medicine*, 37(2), 84–92. <https://doi.org/10.1055/s-0039-3400992>

Hernandez, M. (2002). *Motivación animal y humana*.

Herrera-Morales, W. V., Herrera-Solís, A., & Núñez-Jaramillo, L. (2019). Sexual Behavior and Synaptic Plasticity. *Archives of Sexual Behavior*, 48(8), 2617–2631. <https://doi.org/10.1007/s10508-019-01483-2>

Hull, E. M., Muschamp, J. W., & Sato, S. (2004). Dopamine and serotonin:

- Influences on male sexual behavior. *Physiology and Behavior*, 83(2), 291–307. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.08.018>
- Hull, E. M., & Rodríguez-Manzo, G. (2017). Male Sexual Behavior. In *Hormones, Brain and Behavior: Third Edition* (3rd ed., Vol. 1). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803592-4.00001-8>
- Hull, E.M., & Rodríguez-Manzo, G. (2009). Male Sexual Behavior. In *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience* (2nd ed., pp. 5–65).
- Hull, Elaine M, & Dominguez, J. M. (2007). Sexual Behavior in Male Rodents. *Horm Behav*, 52(1), 45–55.
- Humphries, M. D., & Prescott, T. J. (2010). The ventral basal ganglia, a selection mechanism at the crossroads of space, strategy, and reward. *Progress in Neurobiology*, 90(4), 385–417. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.11.003>
- Hurtazo, H. A., Paredes, R. G., & Ågmo, A. (2008). Inactivation of the medial preoptic area/anterior hypothalamus by lidocaine reduces male sexual behavior and sexual incentive motivation in male rats. *Neuroscience*, 152(2), 331–337. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.10.063>
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & M., J. T. (2001). *Principios de Neurociencia* (4th ed.).
- Katz, L. S., Price, E. O., Wallach, S. J., & Zenchak, J. J. (1988). Sexual performance of rams reared with or without females after weaning. *Journal of Animal Science*, 66(5), 1166–1173. <https://doi.org/10.2527/jas1988.6651166x>
- Kikusui, T., Kajita, M., Otsuka, N., Hattori, T., Kumazawa, K., Watarai, A., Nagasawa, M., Inutsuka, A., Yamanaka, A., Matsuo, N., Covington, H. E., & Mogi, K. (2018). Sex differences in olfactory-induced neural activation of the amygdala. *Behavioural Brain Research*, 346(August), 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.11.034>
- Kim, J. I., Lee, J. W., Lee, Y. A., Lee, D. H., Han, N. S., Choi, Y. K., Hwang, B. R., Kim, H. J., & Han, J. S. (2013). Sexual activity counteracts the

- suppressive effects of chronic stress on adult hippocampal neurogenesis and recognition memory. *Brain Research*, 1538, 26–40. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.09.007>
- Kirkpatrick, B., Williams, J. R., Slotnick, B. M., & Carter, C. S. (1994). Olfactory bulbectomy decreases social behavior in male prairie voles (*M. ochrogaster*). *Physiology and Behavior*, 55(5), 885–889. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)90075-2](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90075-2)
- Le Moëne, O., & Ågmo, A. (2019). Modeling Human Sexual Motivation in Rodents: Some Caveats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00187>
- Leal-Galicia, P., Romo-Parra, H., Rodríguez-Serrano, L. M., & Buenrostro-Jáuregui, M. (2019). Regulation of adult hippocampal neurogenesis exerted by sexual, cognitive and physical activity: An update. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 101(July), 101667. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2019.101667>
- Lehman, M. N., Powers, J. B., & Winans, S. S. (1983). Stria terminalis lesions alter the temporal pattern of copulatory behavior in the male golden hamster. *Behavioural Brain Research*, 8(1), 109–128. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(83\)90174-2](https://doi.org/10.1016/0166-4328(83)90174-2)
- Lenschow, C., & Lima, S. Q. (2020). In the mood for sex: neural circuits for reproduction. *Current Opinion in Neurobiology*, 60, 155–168. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.12.001>
- Leuner, B., Glasper, E. R., & Gould, E. (2010). Sexual experience promotes adult neurogenesis in the hippocampus despite an initial elevation in stress hormones. *PLoS ONE*, 5(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011597>
- Li, L., Tasic, B., Micheva, K. D., Ivanov, V. M., Spletter, M. L., Smith, S. J., & Luo, L. (2010). Visualizing the distribution of synapses from individual neurons in the mouse brain. *PLoS ONE*, 5(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011503>
- Maeda, I., Tajima, S., Ariizumi, Y., Doi, M., Endo, A., Naruki, S., Hoshikawa, M., Koizumi, H., Kanemaki, Y., Ueno, T., Tsugawa, K., & Takagi, M. (2016). Can

synaptophysin be used as a marker of breast cancer diagnosed by core-needle biopsy in epithelial proliferative diseases of the breast? *Pathology International*, 66(7), 369–375. <https://doi.org/10.1111/pin.12420>

Marcondes, F. K., Bianchi, F. J., & Tanno, A. P. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: Some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*, 62(4 A), 609–614. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842002000400008>

Melis, M. R., & Argiolas, A. (1995). Dopamine and sexual behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 19(1), 19–38. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(94\)00020-2](https://doi.org/10.1016/0149-7634(94)00020-2)

Micevych, P. E., & Meisel, R. L. (2017). Integrating neural circuits controlling female sexual behavior. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2017.00042>

Micevych, P., & Sinchak, K. (2013). Temporal and concentration-dependent effects of oestradiol on neural pathways mediating sexual receptivity. *Journal of Neuroendocrinology*, 25(11), 1012–1023. <https://doi.org/10.1111/jne.12103>

Micevych, Paul, & Sinchak, K. (2008). Estradiol regulation of progesterone synthesis in the brain. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 290(1–2), 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.04.016>

Miller, S. M., Marcotulli, D., Shen, A., & Zweifel, L. S. (2019). Approach – Avoidance Conflict Behavior. *Nature Neuroscience*, 22(April), 565–575. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0337-z>.Divergent

Navone, F., Jahn, R., Gioia, G. Di, Stukenbrok, H., Greengard, P., & Camilli, P. De. (1986). Protein p38: An integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells. *Journal of Cell Biology*, 103(6), 2511–2527. <https://doi.org/10.1083/jcb.103.6.2511>

Nestler, E. J., & Carlezon, W. A. (2006). The Mesolimbic Dopamine Reward Circuit in Depression. *Biological Psychiatry*, 59(12), 1151–1159. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.09.018>

- Newman, S. W. (1999). The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 877, 242–257. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb09271.x>
- O'Connell, L. A., & Hofmann, H. A. (2011). The Vertebrate mesolimbic reward system and social behavior network: A comparative synthesis. *Journal of Comparative Neurology*, 519(18), 3599–3639. <https://doi.org/10.1002/cne.22735>
- Okuyama, T. (2018). Social memory engram in the hippocampus. *Neuroscience Research*, 129, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.05.007>
- Paredes, R. G. (2009). Evaluating the neurobiology of sexual reward. *ILAR Journal*, 50(1), 15–27. <https://doi.org/10.1093/ilar.50.1.15>
- Paredes, R. G. (2014). Opioids and sexual reward. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 121, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.11.004>
- Paredes, R. G., & Ågmo, A. (2004). Has dopamine a physiological role in the control of sexual behavior? A critical review of the evidence. *Progress in Neurobiology*, 73(3), 179–225. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2004.05.001>
- Parson, B., Rainbow, T. C., Pfaff, D. W., & McEwen, B. S. (1981). Oestradiol, sexual receptivity and cytosol progesterin receptors in rat hypothalamus. *Nature*, 292.
- Paxinos, G., & Watson, C. (1997). *The Rat Brain In Stereotaxic Coordinates* (Third).
- 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>
- Price, E. O. (1987). Male Sexual Behavior. *Farm Animal Behavior*, 3(2), 405–422. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)31161-0](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)31161-0)
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A.-S.,

- McNamara, J. O., & Williams, S. M. (2004). Neuroscience. In *Encyclopedia of Biomedical Gerontology* (3rd ed.). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.62132-3>
- Robbins, T. W., & Everitt, B. J. (1992). Functions of dopamine in the dorsal and ventral striatum. *The Neurosciences*, *4*, 119–127.
- Roselli, C. E., Reddy, R. and Kaufman, R. (2011). The Development of Male-Oriented Behavior in Rams. *Front Neuroendocrinol*, *32*(2), 11. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2010.12.007>.The
- Sah, P., Faber, E. S. L., Lopez De Armentia, M., & Power, J. (2003). The Amygdaloid Complex: Anatomy and Physiology. *Physiol Rev*, *83*, 803–834. <https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2003.-A>
- Settembrini, P. (1985). *Thesis de Posgrado. Estructuras quimiorreceptoras en las fosas nasales de la rata : Su relación con la regulación endocrina de la reproducción*. Universidad de Buenos Aires (UBA).
- Sheehan, T., Paul, M., Amaral, E., Numan, M. J., & Numan, M. (2001). Evidence that the medial amygdala projects to the anterior/centromedial hypothalamic nuclei to inhibit maternal behavior in rats. *Neuroscience*, *106*(2), 341–356. www.elsevier.com/locate/neuroscience
- Shulman, L. M., & Spritzer, M. D. (2014). Changes in the sexual behavior and testosterone levels of male rats in response to daily interactions with estrus females. *Physiology and Behavior*, *133*, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.05.001>
- Snoeren, E. M. S., Veening, J. G., Olivier, B., & Oosting, R. S. (2014). Serotonin 1A receptors and sexual behavior in male rats: A review. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *121*, 102–114. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.11.007>
- Swanson, L. W. (2000). Interactive report Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. *Brain Research*, *886*, 113–164. www.elsevier.com/locate/bres
- Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E. A., Grønborg, M., Riedel, D.,

- Urlaub, H., Schenck, S., Brügger, B., Ringler, P., Müller, S. A., Rammner, B., Gräter, F., Hub, J. S., De Groot, B. L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmüller, H., ... Jahn, R. (2006). Molecular Anatomy of a Trafficking Organelle. *Cell*, *127*(4), 831–846. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.030>
- Tata, D. A., Dandi, E., & Spandou, E. (2021). Expression of synaptophysin and BDNF in the medial prefrontal cortex following early life stress and neonatal hypoxia-ischemia. *Developmental Psychobiology*, *63*(2), 173–182. <https://doi.org/10.1002/dev.22011>
- Tlachi-López, J. L., Eguibar, J. R., Fernández-Guasti, A., & Lucio, R. A. (2012). Copulation and ejaculation in male rats under sexual satiety and the Coolidge effect. *Physiology and Behavior*, *106*(5), 626–630. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.04.020>
- Toda, T., & Gage, F. H. (2018). Review: adult neurogenesis contributes to hippocampal plasticity. *Cell and Tissue Research*, *373*(3), 693–709. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2735-4>
- Ventura-Aquino, E., & Paredes, R. G. (2017). Animal Models in Sexual Medicine: The Need and Importance of Studying Sexual Motivation. *Sexual Medicine Reviews*, *5*(1), 5–19. <https://doi.org/10.1016/j.sxmr.2016.07.003>
- Ventura-Aquino, E., Portillo, W., & Paredes, R. G. (2018). Sexual Motivation: A Comparative Approach in Vertebrate Species. *Current Sexual Health Reports*, *10*(3), 114–123. <https://doi.org/10.1007/s11930-018-0156-3>
- West, A. R., Galloway, M. P., & Grace, A. A. (2002). Regulation of striatal dopamine neurotransmission by nitric oxide: Effector pathways and signaling mechanisms. *Synapse*, *44*(4), 227–245. <https://doi.org/10.1002/syn.10076>
- Williams, G. W., Goldman, J., McGinnis, M. Y., Possidente, B., & Lumia, A. R. (1991). Effects of ovarian hormones on sexual receptivity, proceptivity, and motivation in olfactory bulbectomized female rats. *Physiology and Behavior*, *50*(4), 751–755. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(91\)90013-E](https://doi.org/10.1016/0031-9384(91)90013-E)
- Woodson, J. C. (2002). Including “learned sexuality” in the organization of sexual behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *26*(1), 69–80. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(01\)00039-2](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(01)00039-2)

- Xie, Y., & Dorsky, R. I. (2017). Development of the hypothalamus: Conservation, modification and innovation. *Development (Cambridge)*, 144(9), 1588–1599. <https://doi.org/10.1242/dev.139055>
- Yang, T., & Shah, N. M. (2016). Molecular and neural control of sexually dimorphic social behaviors. *Current Opinion in Neurobiology*, 38, 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.04.015>
- Zenchak, J. J. & Anderson G. C. (1980). Sexual performance levels of rams (*Ovis Aries*) as affected by social experiences during rearing. *Journal of Animal Science*, 50(1), 167-174. <https://doi.org/10.2527/jas1980.501167x>