



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

TÍTULO DE LA TESIS

**"LA CÓPULA COMO UN ESTÍMULO REFORZANTE PARA EL RATÓN
HEMBRA EVALUADO POR EL PARADIGMA DE LA PREFERENCIA
DE LUGAR CONDICIONADA Y MOTIVACIÓN SEXUAL INCENTIVA"**

Tesis que para obtener el título de

Licenciatura en biología

PRESENTA

ALAN MÁRQUEZ BORJA

ASESOR DE TESIS:

**DOCTORA WENDY PORTILLO MARTÍNEZ
DOCTORA ANGÉLICA TRUJILLO HERNÁNDEZ**



Septiembre 2015

Índice	
Agradecimientos	3
Resumen	4
Abstract	4
Introducción	5
Capítulo 1. Conducta sexual	7
1.1. Conducta sexual regulada por la hembra	8
1.2. Conducta sexual no regulada por la hembra	9
Capítulo 2. Reforzamiento sexual	10
2.1. Tipos de reforzadores	10
2.2. Estado afectivo positivo	10
2.3. Paradigma de preferencia de lugar condicionado	11
Capítulo 3. Motivación sexual incentiva	11
Justificación	12
Hipótesis	13
Objetivos	13
Capítulo 4. Materiales y métodos	14
4.1. Sujetos	14
4.2. Cópula regulada	15
4.3. Cópula no regulada	15
4.4. Preferencia de lugar condicionado	15
4.5. Motivación sexual incentiva	19
Capítulo 5. Análisis estadístico	20
Capítulo 6. Resultados	21
6.1. Conducta sexual	21
6.2. PLC con morfina vs solución salina	21
6.3. PLC en hembras con CR y CNR	22
6.4. MSI en hembras CR y CNR	26
6.5. MSI en hembras inexpertas vs macho experto	26
6.6. MSI en macho inexperto vs macho experto	26
Capítulo 7. Discusión y conclusiones	27
Bibliografía citada	30

Agradecimientos

A todos los integrantes del laboratorio de Conducta sexual y plasticidad, por haberme ayudado y guiado durante la realización de este trabajo. A la Doctora Wendy por todo su apoyo, paciencia, confianza, resolver mis dudas y por brindarme la oportunidad de trabajar en este proyecto. A Francisco por su apoyo, consejo y supervisión en el trabajo del laboratorio. Al Doctor Raúl, por sus consejos y resolver mis dudas que surgían a lo largo del proyecto. A Min, Monse, Miriam, por estar siempre dándome ideas en la parte práctica y teórica. A Rey, Nela, Mel, Lucy, Beba, Felipe por la motivación de llevar a término este trabajo.

A mi familia por motivarme a crecer académicamente, por todo el apoyo al darme su confianza, cariño, paciencia y aliento. A mi padre Víctor y su esposa, Gaby, por el apoyo desde que inicié la carrera. A mi madre Lety y su esposo, Miguel, por todo el apoyo y paciencia. A mis abuelos, Mamá Vita, dónde sea que esté, sé que estaría orgullosa... a Papá Isaías, por todos sus sabios consejos y sus regaños sin ser regaños. A mi primo Arturo y su esposa, Rosy, por todo el apoyo que me dieron durante mi estancia en Querétaro. A mi tía y madrina Rebe por sus palabras cada vez que hablaba por teléfono con ella. A mis tíos Benjamín y Amelia que daban apoyo y buenos consejos en innumerables ocasiones. A mi primo Jesús Abraham quien fue parte fundamental para no tirar la toalla.

A mis amigos de la prepa, Marco, Armando, Omar, Alito, Sol, Montse, por estar ahí siempre en las buenas y las malas. A mis amigos de la universidad por sus consejos, sus discusiones y su aliento Raúl, Armando, Katia, Nohelia, Paul, Corro, Mariana, Saúl, Aki, Pablo y Ana.

Resumen

La cópula es una conducta que permite la reproducción y por lo tanto perpetuar la especie; los individuos la realizan porque les induce estados afectivos positivos (placenteros). De esta forma, en la rata hembra, se ha demostrado que la conducta sexual en condiciones en las que puede regular la intensidad de la estimulación genital induce estados afectivos positivos, evaluados por la prueba de preferencia de lugar condicionada. Además se ha demostrado que en las ratas, la experiencia sexual induce una clara preferencia por el sexo opuesto en pruebas de motivación sexual incentiva. Se desconoce en el biomodelo del ratón si la hembra requiere de regular la copula para que esta conducta le genere estados afectivos positivos y si la experiencia sexual es necesaria para que estos individuos estén motivadas sexualmente por el macho. Por lo que estos aspectos fueron abordados en el presente estudio.

Abstract

Sexual behavior is a matter of common acts done it by animals as reproduction, letting behind offspring to perpetuate the species. This has been studied under several paradigms that sexual interaction is reinforcement stimulation and induces sexual motivation for the sexually active male. There has been many studies with rats both female and male, and it has been demonstrated the roll of sexual behavior as well as reinforcement stimulation. This it's unknown it to apply on mice, ass the same way has been done on rats. On this study, we evaluate if the female mice are able to pace the sexual interaction and if this stimuli is rewarding. Also we want to evaluate if the sexual experience induce sexual motivation for the sexually active male. To achieve this goal we perform a conditioned place preference and sexual motivation test.

Introducción

La cópula es una conducta que se lleva a cabo en muchas especies de mamíferos permitiendo la perpetuación de estas. Sin embargo, no se ha demostrado que los individuos que se reproducen mediante encuentros sexuales puedan asociar que la cópula tiene como consecuencia dejar descendencia (Agmo, 1999). Anders Agmo ha propuesto que los animales copulan debido a que esta conducta les induce estados afectivos positivos (placer), por este hecho esta conducta es repetida. En los roedores hembra la conducta sexual tiene dos componentes el motivacional y el de ejecución. Las conductas motivacionales son aquellas que llevan a la búsqueda de un individuo del sexo opuesto y comprenden exploración de los genitales, aseo del compañero y vocalizaciones ultrasónicas. La conducta de ejecución o proceptividad, en la hembra, se muestra mediante el reflejo de lordosis el cual consiste en arquear el cuerpo, levantar y desviar la cola para permitir la inserción del pene en la vagina (Erskine, 1989; Garey et al, 2002; Ellingsen & Agmo, 2004). La motivación como la ejecución depende de la liberación cíclica de estradiol y progesterona (Erskine & Baum, 1982; Bruijn et al, 1988).

En condiciones de laboratorio, hay dos paradigmas en los cuales los roedores hembras pueden copular, con los cuales se pretende representar condiciones semi-naturales. En la primera forma se permite que el macho regule la interacción sexual y en la segunda es la hembra quien la regula. En la primera situación, se coloca una hembra sexualmente receptiva en una caja de acrílico con un macho sexualmente experto, de esta forma la hembra no puede escapar y el macho regula la conducta sexual. En la segunda opción la caja es dividida en dos compartimentos de igual tamaño por una barrera de acrílico en la cual en la parte inferior contiene una abertura por donde solo puede pasar la hembra, de esta forma el macho queda confinado en un compartimento de la caja y la hembra puede pasar libremente de un compartimento a otro y regular la copula (Paredes & Alonso, 1997; Arzate, et al, 2011). Estudios de la Dra. Erskine han demostrado que solamente cuando la rata hembra regula la interacción sexual, se evita la sobre estimulación vaginal. Esta evitación de la sobre estimulación tiene efectos fisiológicos ya que la cópula regulada incrementa la probabilidad de que la hembra quede gestante e incrementan sus niveles de prolactina (Erskine & Baum, 1982; Erskine, et al, 1989).

Nuestro grupo de investigación demostró que solamente cuando la rata hembra regula la cópula, esta actividad les induce estados afectivos positivos evaluados por el cambio de preferencia de lugar condicionado (PLC) (Martínez & Paredes, 2001). De manera interesante, en la rata hembra, solamente la estimulación sexual regulada induce cambios plásticos en el sistema nervioso central, en el área del bulbo olfatorio principal y accesorio. Es decir, solo en las ratas hembras que regulan la cópula, se observa un incremento en el número de células nuevas que llegan al bulbo olfatorio accesorio (Arzate, et al, 2011; Corona et al., 2011).

En otras especies de roedores, como el ratón, no se ha realizado un análisis tan exhaustivo de la conducta sexual como en la rata. Los ratones difieren en su conducta sexual de la rata en varios aspectos. Los machos al copular sólo eyaculan una vez, después de varias montas e intromisiones. En algunos casos eyaculan con pocas o inclusive una sola intromisión (Johansen, et al, 2008). Mientras que la rata macho puede eyacular hasta 8 veces seguidas antes de alcanzar la saciedad sexual y para eyacular requieren entre 5 y 10 intromisiones (Erskine & Baum, 1982).

En cuanto al ratón se ha reportado que las hembras no presentan conductas para atraer al macho (componente motivacional) y se ha propuesto que ella puede regular la intensidad de la estimulación sexual al no presentar el reflejo de lordosis y adoptar una postura de ovillo que impide la penetración vaginal. La rata hembra en cambio presenta conductas de atraktividad como son desplazamiento en zig-zag, movimiento de las orejas y brincoteo (Blaustein & Mani 2006) y en la rata hembra es claro que ella no puede evitar la estimulación sexual mediante no presentar el reflejo de lordosis (Gilman, et al, 1979; Corona et al., 2011).

Para que un sujeto inicie la cópula es necesario que este sexualmente motivado, por lo que el macho debe de ser capaz de reconocer a las hembras de su misma especie y detectar su estado hormonal. Las hembras requieren identificar a un macho y permitir su aproximación. De esta forma se ha reportado en la rata que los machos prefieren la proximidad de una hembra sexualmente receptiva y las hembras pasan más tiempo cerca de un macho activo (Hetta & Meyerson, 1978; Bakker, et al., 1996; Domínguez-Salazar, et al., 2002).

En la rata, se ha demostrado que una hembra sexualmente receptiva prefiere el compartimento donde se localiza un macho sexualmente activo que el compartimento donde se encuentra una hembra sexualmente receptiva, mientras tanto, una hembra no receptiva no tiene preferencia por ningún sujeto estímulo. En el ratón hembra se desconoce si está motivado sexualmente por el macho y si esta motivación depende de su experiencia sexual.

Para que un roedor pueda detectar y preferir a un conespecífico utiliza principalmente su sentido del olfato. En el ratón se ha reportado que las hembras prefieren los olores volátiles de un macho gonadalmente intacto sobre los olores de un macho gonadectomizado. Esta preferencia es innata ya que se ha observado en hembras sexualmente inexpertas y no depende del ciclo hormonal (Scott & Pfaff, 1970; Jemiolo et al., 1991). Posteriormente se aislaron dos compuestos que conforman la orina del ratón macho gonadalmente intacto el thiazoline y el dehidrobrevicomín los cuales al ser mezclados con la orina de machos gonadectomizados hacen que este tipo de orina sea atractivo para la hembra (Baum & Kelliher, 2009). De la misma forma Jemiolo y colaboradores (1991) demostraron que los compuestos α y β farnesenos extraídos de la glándula del prepucio al ser mezclados con agua resultan ser atractivos para las hembras sin experiencia sexual. Esto es que en el ratón hembra con o sin experiencia sexual, los olores sexualmente relevantes del macho le son atractivos.

En el ratón hembra se desconoce si la hembra puede regular la interacción sexual, si esta estimulación induce estados afectivos positivos y si la experiencia sexual conlleva a que las hembras desarrollen una preferencia sexual por los machos sexualmente activos. Por lo que estos aspectos serán evaluados en el presente estudio.

Capítulo 1. Conducta sexual

Las interacciones sexuales son eventos que se dan durante los encuentros reproductivos y estos varían entre las especies. En los roedores, tal es el ejemplo de la rata, se ha descrito esta conducta bajo condiciones de laboratorio, tratando de asemejar las semi-naturales (Gilman et al., 1979; Erskine & Baum, 1982; Erskine, et al, 1989; Paredes & Alonso,

1997). En los machos se evalúa el número y latencia de montas, intromisiones y eyaculación; en las hembras se evalúa la respuesta de lordosis, la cual consiste en arquear el cuerpo y desviar la cola para permitir la inserción del pene (Gilman, et al, 1979).

En el ratón macho la conducta sexual difiere del comportamiento de otros roedores como la rata. El ratón macho es territorial ya que no permite que otros machos estén dentro de su territorio o que copulen con las hembras que están en dicha zona (Johansen, et al, 2008). Cuando el macho realiza la intromisión esta se lleva a cabo por movimientos pélvicos superficiales, cada vez que repite la conducta los movimientos son cada vez más profundos; después de cierto número de intromisiones el macho eyacula. En este momento el macho mientras realiza la intromisión se aferra a la hembra con sus cuatro extremidades y se va hacia un costado sin apartarse de ella, en este estado permanece hasta 13-30 segundos antes de desmontar a la hembra o en que ella se libera del macho (Hull & Dominguez, 2007). Durante la interacción sexual el ratón hembra puede recibir mayor estimulación que una rata hembra (Johansen et al., 2008).

Joan Garey y colaboradores (2002) demostraron que el ratón hembra no presenta conductas para atraer al macho es decir no se puede observar una conducta proceptiva, como se presenta, por ejemplo, en la rata hembra la cual orejea, corre en zig-zag, realiza una identificación ano-genital y vocalizaciones. Sin embargo, se puede apreciar que, durante un encuentro sexual, permanece quieta y permite que el macho haga una exploración ano-genital. Cuando se encuentra sexualmente receptiva se puede presentar la lordosis para permitir que el macho pueda realizar la penetración peneana. Después de cierto número de montas e intromisiones, se presenta una sobre estimulación vaginal por lo cual la hembra rechaza al macho mediante morderlo o patearlo.

En condiciones de laboratorio se han establecido dos estrategias para poder evaluar la conducta sexual, dichas estrategias serán descritas a continuación (Garey, et al, 2002).

1.1. Cópula no regulada por la hembra

Esta conducta es llevada a cabo cuando la hembra no tiene la posibilidad de escapar

o evitar la interacción sexual. Sin embargo, el macho puede ser rechazado cuando la hembra vocaliza, lo muerde o pelea con él. Aun cuando ella trate de evitar la cópula, si esta se encuentra receptiva, el macho seguirá intentando hasta que tenga la oportunidad de realizar la monta e intromisión hasta eyacular. En el caso del ratón macho la conducta sexual termina después de una eyaculación, para que retome la cópula pueden pasar desde 45 minutos hasta dos o más horas (Hull & Dominguez, 2007). Esto podría deberse a que el ratón macho realiza un mayor número de movimientos pélvicos durante la interacción en comparación con la rata.

1.2. Conducta sexual regulada por la hembra

Cuando la hembra tiene la posibilidad de regular la interacción. Esto se obtiene cuando la hembra tiene la opción de escapar del macho, es decir, ella va a decidir si entra en el espacio donde se encuentra el macho o se queda fuera del alcance de este. Esto es posible al poner una barrera física que le servirá como un medio de escape del macho. Esta barrera tiene la finalidad de representar un medio ambiente bajo condiciones semi-naturales adaptadas en el laboratorio.

Johansen et al., 2008 evaluaron en el ratón hembra la cópula en condiciones reguladas para lo cual utilizaron una caja de acrílico con una barrera con agujeros, que permitía la entrada y salida de la hembra, estos agujeros estaban condicionados para impedir el paso del macho debido a su tamaño corporal, además, a los machos se les colocó un collar alrededor del cuello atado a un anillo en la parte superior de la caja. Usando esta estrategia este grupo demostró que, tras cada salida del compartimento donde se encuentra el macho, la hembra mostraba largas latencias para retomar la cópula. También reportaron que la intromisión no fue un estímulo reforzante para permitir que la hembra regresará al compartimento del macho más rápido y frecuentemente para continuar con la interacción sexual (Johansen et al., 2008).

Capítulo 2. Reforzamiento sexual

Agmo (1999) ha propuesto que la cópula se realiza por los estados afectivos positivos

que induce. En nuestra especie hemos tratado de disociar los efectos placenteros de la cópula con la reproducción mediante el uso de anticonceptivos. En otras especies de mamíferos no se ha podido demostrar que ellos puedan asociar la cópula con la reproducción. Por lo anterior se ha propuesto que la cópula es una conducta que se repite porque induce estados afectivos positivos, en los roedores la forma de evaluar estos estados es utilizando la prueba de preferencia de lugar condicionada (PLC). A continuación describiré los tipos de reforzadores, los estados positivos afectivos y como se realiza la prueba de PLC.

2.1 Tipos de reforzadores

Reforzador: estímulo que incrementa la probabilidad de una respuesta/conducta. Estos están asociados a la presentación de estímulos positivos o al remover los estímulos aversivos (Paredes, 2009; Paredes & Fernández-Guasti, 2008).

Estímulo recompensante es aquel que genera una conducta de acercamiento. Esta conducta normalmente se asocia a la motivación incentiva inducida por un estado afectivo positivo. Es decir, cuando nosotros hablamos de este tipo de estímulo o estado nos referimos, en un individuo no humano, a un estímulo placentero que está estrechamente vinculado con la conducta que induce, en este caso, la cópula es un estímulo que da pauta a que el individuo este motivado a acercarse a otro sujeto por la asociación de una conducta sexual previa (Paredes & Fernández-Guasti, 2008; Paredes, 2009).

2.2 Estado afectivo positivo

Es complicado hablar de placer en otros organismos que no sean el ser humano. Sin embargo, podemos establecer que los roedores presentan estados afectivos positivos (EAP) (Paredes & Fernández-Guasti, 2008; Paredes, 2009), inducidos por algún estímulo específico. Por ejemplo, dentro de los reforzadores naturales que pueden inducir EAP podemos encontrar al consumo de alimentos, el ejercicio, la conducta sexual, entre otros (Moss, 1924; Paredes & Fernández-Guasti, 2008; Paredes, 2009). Estos EAP se pueden evaluar mediante la conducta de acercamiento hacia el incentivo.

2.3 Paradigma de preferencia de lugar condicionado

El paradigma de PLC fue originalmente propuesto por Beach (Beach, 1957) y es un método que se emplea comúnmente para evaluar el estado afectivo positivo, que puede ser inducido por reforzadores naturales o por drogas (Portillo & Paredes, 2009). Esta prueba se realiza en una caja de acrílico con 3 compartimentos que difieren en color (blanco, gris y negro), textura (dosel rugoso y/o suave) y olor (con aroma y sin aroma) (Camacho, et al, 2004; Camacho, et al, 2009a; Camacho, et al, 2009b; Arzate et al., 2011). La prueba inicialmente consiste en una pre-prueba en la que el individuo elige un compartimento de su preferencia, posteriormente se refuerza el compartimento que no prefirió, esto se realiza exponiendo al individuo a un estímulo reforzante y se coloca en el compartimento no preferido y al día siguiente no se administra un estímulo reforzante y se coloca al animal en el compartimento preferido. Finalmente en la prueba sin la presencia del estímulo reforzante se evalúa que compartimento prefiere el sujeto experimental (Paredes & Alonso, 1997; Paredes & Martínez, 2001; Camacho, et al. 2004; Portillo & Paredes, 2009).

Capítulo 3. Motivación sexual incentiva

La motivación sexual incentiva (MSI), consiste en la “búsqueda” o “deseo” del contacto sexual entre los individuo, ya sea un macho sexualmente vigoroso o una hembra sexualmente receptiva (Meyerson & Lindström, 1973; Agmo, 1999). La MSI es inducida por diversos estímulos que son sexualmente relevantes para el macho y la hembra en los que destacan la percepción de feromonas, las vocalizaciones ultrasónicas y la identificación visual del individuo (Agmo, 1999; Agmo 2003; Portillo & Paredes, 2003; Portillo & Paredes, 2004).

La primera es la forma de entender que la conducta se repita, en otras palabras, cuando el estímulo es positivo (reforzante) este genera motivación (Whalen, 1966). En el caso de la motivación sexual puede activar la conducta sexual. Cuando el acercamiento incentivo establecido tiene continuidad, se puede llevar a cabo la ejecución de los reflejos copulatorios, desencadenados por la excitabilidad del sujeto (Whalen 1966; Agmo, 1999). En

el caso contrario, al no haber una respuesta que genere un acercamiento se observará el patrón conductual de la huida o escape, esto se le conoce como un estímulo negativo (Agmo, 1999). Entonces la cópula es una conducta inducida por un estímulo social, entre machos o hembras cuando hay un encuentro cercano entre dos sujetos. Esta aproximación de los sujetos activa varios estímulos sensoriales para la atracción del sexo opuesto, que en el caso de los roedores, es detectado por la olfacción principalmente (Paredes & Fernández-Guasti, 2008). La prueba de MSI consiste en colocar al sujeto de estudio al centro de una caja en la cual en sus dos extremos opuestos y paralelos se colocan compartimentos removibles en los que se pueden colocar un macho sexualmente experto o una hembra sexualmente receptiva. La zona en la proximidad de las cajas removibles se denomina zona incentiva. De esta manera podemos conocer que zona prefiere el animal experimental. En este caso se espera que una hembra sexualmente receptiva prefiera la zona incentiva del macho sexualmente activo pero no la zona de otra hembra (Agmo, 2003; Portillo & Paredes, 2003; Portillo & Paredes, 2004; Paredes, 2009).

Justificación

En la rata hembra se ha descrito que cuando regula la interacción sexual, la cópula induce un estado afectivo positivo, ya que tiene la posibilidad de evitar la sobre estimulación sexual. De esta forma en la cópula regulada la hembra recibe un número menor de intromisiones y los intervalos entre cada intromisión son más largos (Erskine & Baum, 1982). En el ratón hembra se desconoce si la hembra requiere regular la cópula para que esta conducta le pueda inducir estados afectivos positivos.

Así mismo se ha descrito que en la rata hembra la experiencia sexual genera preferencia por la proximidad de un macho sexualmente activo (motivación sexual) en lugar de preferencia por una hembra receptiva (Agmo, 1999). En el ratón hembra se desconoce si la estimulación sexual en cópula regulada y no regulada genera una motivación sexual por un macho sexualmente experto. De la misma forma no se ha evaluado si la motivación sexual de la hembra por el macho depende de su experiencia sexual previa.

Hipótesis

1. En el ratón hembra, la estimulación sexual durante la cópula regulada será de menor intensidad en comparación con la cópula no regulada. Es decir la hembra recibirá un número menor de intromisiones, los intervalos inter-intromisión serán más largos en comparación con lo observado en hembras que no regulen la cópula.
2. La cópula regulada inducirá estados afectivos positivos evaluados por el paradigma de preferencia de lugar condicionado.
3. La cópula regulada generará preferencia por un macho sexualmente activo en la prueba de motivación sexual incentiva.
4. La experiencia sexual de la hembra inducirá motivación sexual incentiva por el macho.

Objetivos

1. Evaluar las diferencias en la estimulación sexual entre la cópula regulada y no regulada en el ratón hembra.
2. Evaluar si en el ratón hembra la cópula regulada induce estados afectivos positivos evaluados por el paradigma de la preferencia de lugar condicionado.
3. Evaluar si en el ratón hembra la cópula no regulada induce estados afectivos positivos evaluados por el paradigma de la preferencia de lugar condicionado.
4. Evaluar en el ratón hembra si la experiencia sexual en cópula regulada induce preferencia por el macho sexualmente activo evaluada por la prueba de motivación sexual incentiva.
5. Evaluar en el ratón hembra si la experiencia sexual en cópula no regulada induce preferencia por el macho sexualmente activo evaluada por la prueba de motivación

sexual incentiva.

6. Determinar si en la hembra, la experiencia sexual previa afecta la motivación sexual por el macho.

Capítulo 4. Materiales y métodos

4.1. Sujetos

Se utilizaron ratones hembra de la cepa C57BL/6J (figura 1) con un peso entre 25-30 grs y machos de 30-35 grs. Las hembras (8-10 por caja) fueron hospedadas en cajas de acrílico (45x24x21cm), los machos fueron colocados individualmente en cajas de acrílico para ratón. Los animales fueron mantenidos bajo ciclo invertido de luz-oscuridad (12h luz/12H oscuridad; las luces se apagaban a las 10:00hrs) con libre acceso a comida comercial para roedores (LabDiet, 5001 dieta para roedores) y agua purificada *ad libitum*. Las hembras fueron ovariectomizadas bilateralmente, después de la administración de una mezcla de Ketamina (1.04 mg/kg), Xilacina (2.0 mg/kg) y solución salina (6ml). Se dejaron recuperar de la cirugía por dos semanas tras lo cual se les indujo la receptividad por medio del reemplazo hormonal con 0.5 µg/ 50 µl de benzoato de estradiol (BE₂, SIGMA Lot 88H3787) 48 horas previas a las pruebas conductuales y 100 µg/ 50 µl de progesterona (P₄, SIGMA Lot#031M0064V) de 4-6 horas antes de las pruebas conductuales (Johansen, Clemens, & Nunez, 2008). Las hormonas fueron disueltas en aceite de maíz, administradas subcutáneamente. Todos los experimentos fueron llevados a cabo de acuerdo con el “Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud” así como la guía del NIH para el uso de animales. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Uso y Cuidado Animal Institucional.



Figura 1. Ratones hembra y macho, de la cepa C57B/6J, en la caja hogar del macho.

Se realizaron tres pruebas de entrenamiento las cuales se llevaron a cabo en condiciones de cópula no regulada, en estas pruebas se cuantificó la latencia de monta (tiempo de la primera monta), intromisión y eyaculación. Se registró el patrón de lordosis como 0 ó 1 en respuesta a una monta o a una intromisión. Cabe recalcar, que todos los entrenamientos fueron realizados en la caja hogar del macho (Figura 2).

4.2. Cópula regulada

La cópula regulada se realizó en la caja hogar del macho, esta se divide en dos compartimentos iguales con una tabla de madera de 5cm de alto. De esta forma la hembra puede saltar la barrera y entrar o salir del área donde el macho se encuentra, esto proporciona a la hembra la capacidad de regular la interacción sexual (Johansen et al., 2008). Además en esta prueba el macho es entrenado para no cruzar la barrera.

4.3. Cópula no regulada

La cópula no regulada, se realizó en la caja hogar del macho sin ninguna barrera, por esto la hembra no puede regular la cópula. Sin embargo, la hembra puede vocalizar, morder o pelear con el macho, intentando evitar la cópula (Johansen et al., 2008).

4.4. Prueba de preferencia de lugar condicionada (PLC) (Experimento 1 y 2)

La prueba de PLC permitió evaluar si el fármaco y/o la conducta fueron estímulos

reforzantes. De esta forma se han reportado la administración de sustancias de adicción como morfina (Koek, 2014; Portillo & Paredes, 2009), cocaína (Cunningham, et al, 1999), heroína (Sticht, Mitsubata, Tucci, & Leri, 2010) o la estimulación sexual regulada inducen estados afectivos positivos en roedores (Martínez & Paredes, 2001).

La prueba de PLC se realiza en una caja de acrílico donde existen tres compartimentos que difieren en color, olor y textura. De esta forma uno de los compartimentos externos es de color blanco (23×37×32cm), con un piso liso impregnada en las paredes con ácido acético al 2%. En el compartimento central es de color gris (22×24×32 cm), este es un lugar neutro y conecta a los compartimentos externos por puertas removibles (10×32cm). El segundo compartimento externo es de color negro (23×37×32cm), con un suelo de textura rugosa y suave sin ningún tipo de olor (Figura 4). El paradigma de PLC consiste en una pre-prueba en la cual el animal experimental es colocado en el compartimento central, se abren las puertas y se determina que compartimento prefiere. Al día siguiente el animal es colocado por 30 minutos en el compartimento que prefirió (no reforzado) y 24 horas después en el compartimento que no prefirió (reforzado). En este estudio se reforzó con la administración de morfina 1mg/kg (experimento 1) o la estimulación sexual en cópula regulada y no regulada (experimento 2). La prueba de conducta sexual dura 30 minutos o hasta que el macho eyacula. Al finalizar la prueba la hembra es colocada gentilmente en el compartimento no preferido para que pueda asociar el estado inducido por la morfina o la cópula con las características ambientales de la caja. Este proceso se realiza 6 veces como a continuación se describe.

1. Preprueba
2. Lugar preferido sin reforzamiento.
3. Lugar no preferido con reforzamiento.
4. Lugar preferido sin reforzamiento.
5. Lugar no preferido con reforzamiento
6. Lugar preferido sin reforzamiento.
7. Lugar no preferido con reforzamiento.
8. Prueba

Posteriormente se realizar la prueba, bajo las mismas características de la pre-prueba.

Con la finalidad de determinar en una primera instancia si en los ratones hembra es posible inducir estados afectivos evaluados por el paradigma de PLC se obtuvo un grupo adicional de hembras las cuales fueron ovariectomizadas. En este estudio se utilizó como reforzador la administración de morfina, ya que varios grupos de investigación incluido el nuestro han demostrado que consistentemente este fármaco induce estados afectivos que pueden ser evaluados por la prueba de PLC (Paredes & Alonso, 1997). Las hembras se dividieron aleatoriamente en los siguientes grupos: 1) Control, hembras a las cuales se les inyectó solución salina; 2) Morfina, hembras a las cuales se les administro morfina a una concentración de 1mg/kg (Koek, 2014).

Una vez que se demostró que el paradigma de PLC es una buena estrategia para determinar si un estímulo es reforzante en el ratón se evaluó si la copula regulada y la no regulada induce estados afectivos positivos. Para lo cual se obtuvo otro grupo de hembras las cuales fueron ovariectomizadas y remplazadas hormonalmente.

Las hembras fueron entrenadas sexualmente en tres pruebas de copula no regulada. Se siguió esta estrategia porque encontramos que una hembra sexualmente inexperta no pasa al compartimento del macho. Solo se utilizaron aquellas hembras que durante el entrenamiento mostraran un coeficiente de lordosis mayor de 60. Posteriormente las hembras fueron divididas aleatoriamente en dos grupos: a) CNR, fueron aquellas hembras que copularon en dos pruebas en copula no regulada y b) CR, fueron ratones hembras que copularon en dos pruebas en copula regulada.

Para la prueba de PLC, las hembras fueron divididas aleatoriamente en cuatro grupos 1) Cópula no regulada control (CNRC) en este grupo se incluyeron hembras que adquirieron experiencia sexual en CNR, pero que no fueron reforzadas con la estimulación sexual en la prueba de PLC, 2) Cópula no regulada (CNR) hembras que fueron reforzadas con estimulación sexual no regulada, 3) Cópula regulada control (CRC) hembras que adquirieron experiencia en copula regulada pero que no fueron reforzadas con la estimulación sexual en la prueba de PLC y 4) Cópula regulada (CR) hembras que fueron reforzadas con la

estimulación sexual regulada.



Figura 2. Fotografía de ratones hembra y macho en la caja hogar del macho, para llevar a cabo un entrenamiento de conducta sexual, en condiciones de cópula no regulada. Esta fue observada con luz roja.

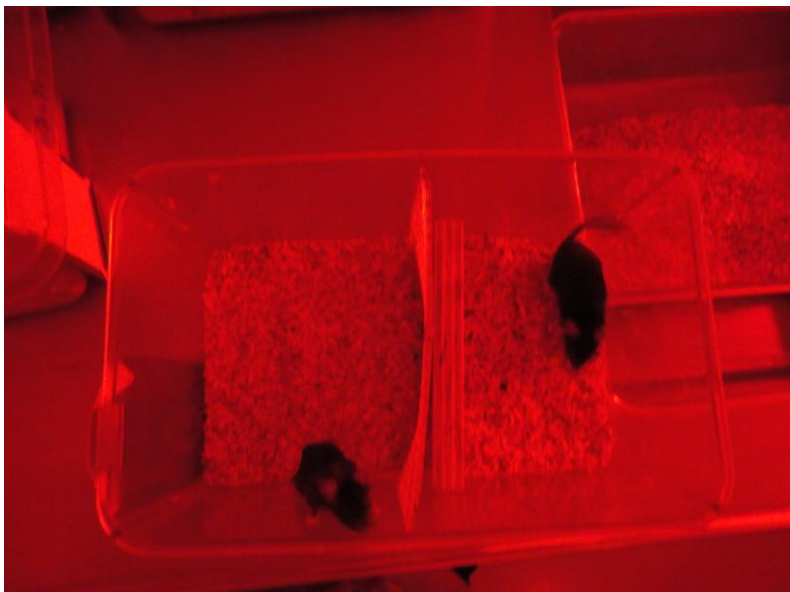


Figura 3. Fotografía donde se observa la caja hogar del macho dividida por una barrera geográfica que tiene la finalidad de ser utilizada para los entrenamientos y pruebas de cópula regulada por la hembra, para que esta tenga la posibilidad de entrar al área del macho o salir de ella según esta decida. El macho es entrenado para no salir de su compartimento.



Figura 4. Prueba de PLC, la cual se realiza en cajas de acrílico divididas en tres compartimentos los cuales difieren en el color, olor y textura. En el compartimento de color negro se empleó un tapete de color naranja para poder distinguir con claridad los ratos, esta cepa es de color negro; el tapete es rugoso y suave, el espacio de color gris, es el compartimento neutral, donde son colocados inicialmente los sujetos de estudio, por último el espacio blanco tiene la característica de que sus paredes son humedecidas con ácido acético al 2% y la textura del suelo es lisa.

4.5. Motivación sexual incentiva (Experimento 3, 4 y 5)

Esta prueba ha sido diseñada para evaluar la motivación sexual. Las ratas macho en esta prueba, muestran una preferencia por la hembra receptiva en lugar de un macho activo. Esta preferencia disminuye con los tratamientos que bajan la actividad sexual. Por ejemplo, en el macho la gonadectomía disminuye el tiempo en que el macho pasa en la zona de la hembra pero no se modifica el tiempo con el macho. En machos gonadectomizados, la administración de testosterona incrementa la conducta sexual y aumenta la preferencia por la zona de la hembra. Más aun en machos que copulan hasta la saciedad y que por lo tanto bajan su actividad sexual muestran una reducción en su preferencia por la hembra. Por lo que esta es una prueba confiable para evaluar motivación sexual incentiva (Agmo, 2003).

La prueba de motivación sexual incentiva se realiza en cajas de acrílico rectangulares (50x100x47cm). Las cuales en los extremos largos opuestos se colocan una caja removible. Una pared de esta caja removible tiene hoyos de 1mm de diámetro y es colocada en contacto con la cara interna de la arena. En una de las cajas removibles se coloca una

hembra sexualmente receptiva y en la otra un macho sexualmente experto (Figura 5). La hembra experimental es colocada en el centro de la arena y mediante el programa Ethovision se registra el tiempo que pasa en el área de los animales estímulos.

Para la evaluación de la motivación sexual incentivada, se utilizaron los grupos de hembras que adquirieron experiencia sexual en pruebas de CNR y CR (experimento 3). En la prueba de motivación sexual incentivada se utilizaron como animales estímulos hembras sexualmente receptivas (HR) y machos sexualmente expertos (ME). Además se evaluó si las hembras con experiencia (experimento 4) sexual tenían una preferencia por un ME o por un macho inexperto (MI). Por último se determinó si hembras sin experiencia sexual (experimento 5) tenían preferencia por una HR o por un ME.

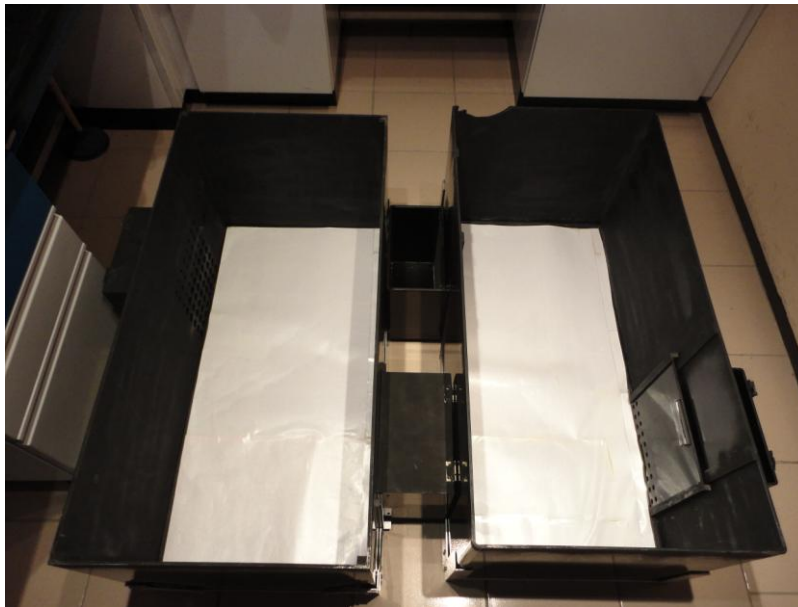


Figura 5. Prueba de MSI. Se realiza en una caja rectangular de acrílico. Como se puede apreciar en la fotografía en las paredes laterales se insertan dos cajas removibles las cuales cuentan con una pared con hoyos que permite que los animales puedan verse, olerse y oírse pero se impide el contacto físico. A la aérea en la vecindad de la caja removible se le denomina zona incentivada.

Capítulo 5. Análisis estadístico

Todos los datos fueron analizados por la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, dado que no tuvieron una distribución normal. En caso de diferencias significativas, se utilizó como post hoc la prueba de U-Mann-Whitney. Los datos fueron analizados en el software del

paquete estadístico SigmaPlot 11.2.

Capítulo 6. Resultados

6.1. Conducta sexual

Encontramos diferencias significativas entre en el grupo de CNR (Tabla1) en la latencia de intromisión (LI) y latencia de eyaculación (LE); así mismo, se identificó con prueba post-hoc que la LI en el primer reforzamiento es significativamente menor con respecto al segundo y tercer reforzamiento ($p<0.01$). En el caso de LE el primer reforzamiento fue significativamente mayor que el segundo y tercer reforzamiento.

En el grupo CR (Tabla 1) no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros conductuales analizados.

6.2. PLC con morfina vs. solución salina.

No encontramos diferencias significativas entre los grupos en la distancia recorrida ni en la velocidad a la cual se mueven lo que indica que los animales no tienen alteraciones motoras que puedan influir en su desempeño en la prueba de PLC (Tabla 2).

En el tiempo en la caja reforzada y el índice de preferencia entre la preprueba y la prueba, encontramos diferencias significativas en los animales que fueron reforzados con morfina ($p<0.009$) (Figura 6-A). En el grupo control tratado con salina no encontramos diferencias en tiempo en el compartimento reforzado. En cuanto al índice de preferencia encontramos diferencias en los animales tratados con morfina ($p<0.005$) pero no en los animales tratados con salina ($p<0.2$). Los ratones hembra tratados con morfina cambiaron su PLC (Figura 6-B).

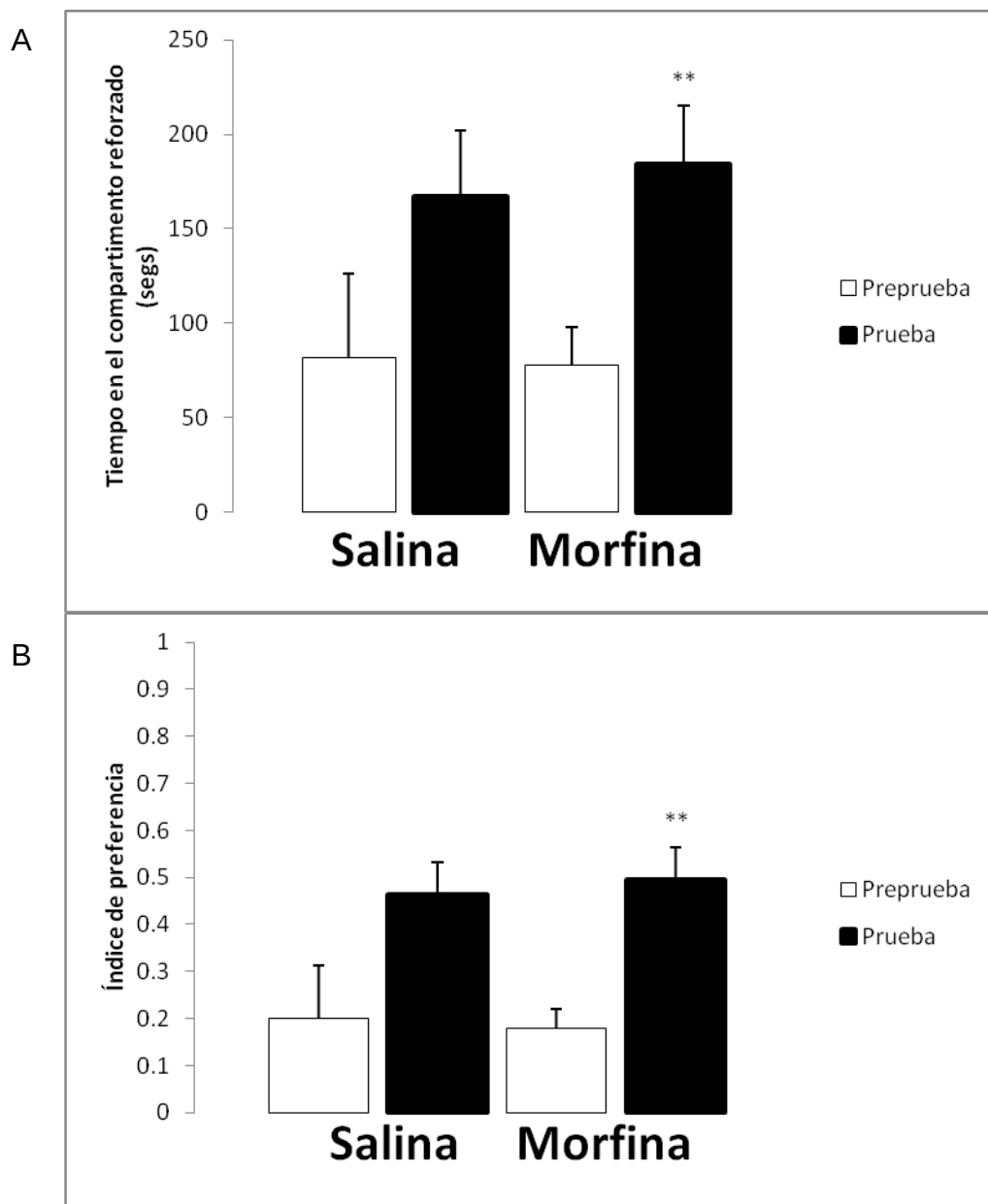


Figura 6

Datos de la prueba de PLC. A) Tiempo de permanencia en el compartimento reforzado, de grupo de solución salina (n=4) y administración de morfina (n=12), hay una diferencia significativa en el grupo de morfina. B) índice de preferencia, donde se muestra que es estadísticamente diferente.

Diferencia estadísticamente significativa * $p < 0.05$.

6.3. PLC en hembras con CR y CNR

En el tiempo en la caja reforzada entre la preprueba y prueba encontramos diferencias significativas. El grupo CNR ($p < 0.02$) y CRC ($p < 0.016$) cambiaron su preferencia de lugar. No se encontraron diferencias significativas en el grupo CNRC y en el control CR (Figura 7-A).

En lo que respecta al índice de preferencia se obtuvo una diferencia significativa en el grupo CRC de acuerdo al análisis estadístico Kruskal-Wallis ($p < 0.05$). No se encontraron diferencias significativas en el grupo CR, CNR y CNRC (Figura 7-B).

Tabla 2

Distancia y velocidad de desplazamiento de la hembra, realizadas durante la prueba de PLC.

	Distancia cm	Velocidad cm/s
CNR	1846.3±387.7	9.89±2.36
CR	2997.3±1456.8	7±1.02

Tabla 3

Distancia y velocidad, realizadas durante la prueba de MSI

	Distancia cm	Velocidad cm/s
MI y ME	1106.6±155.2	7.28571429±1.04
MIN y HIN	1143.7±119.3	6.14±0.5

Nota: Distancia y velocidad presentada en media y error estándar ($\pm$ MES). Cópula no regulada (CNR), cópula regulada (CR), macho inexperto (MI) macho experto (ME), macho sexualmente inexperto (MIN) y hembra sexualmente inexperta (HIN).

Tabla 1

Conducta sexual de ratón hembra, cópula no regulada y regulada durante las tres sesiones de reforzamiento.

	Cópula no regulada			Cópula regulada		
Conducta	1	2	3	1	2	3
NoM	7.12±2.59	3.87±1.52	3.37±0.65	6.84±1.58	8.38±4.11	7.38±2.65
NoI	13.00±5.11	14.12±5.77	11.00±3.16	8.69±2.40	12.07±3.76	15.46±4.92
LM	187.50±89.59	345.00±202.12	667.50±273.18	332.30±88.73	332.30±88.73	244.61±117.17
LI	172.5±69.379	720.00±354.14**	517.05±205.96***	396.92±104.26	729.23±121.87	484.61±141.74
LE	1576.12±233.87	452.50±238.71***	712.50±227.18**	987.69±164.12	1287.69±149.24	1006.15±203.37
LQ	62.00±14.64	64.50±14.68	88.87±4.09	72.38±5.15	87.69±3.55	85.61±4.00
Intervalo Inter-intromisión	629.38±274.1	692.69±286.91	203.97±86.84	266.59±92.49	391.16±159.03	148.46±53.98

Todos los datos están expresados en medias y error estándar (±MES). Número de montas (NoM) número de intromisiones (NoI) (expresadas en número), latencia de monta (LM), latencia de intromisión (LI), latencia de eyaculación (LE) y coeficiente de lordosis (LQ) (expresados en segundos). * Diferente de 1. p<0.05* p<0.01** p<0.001***.

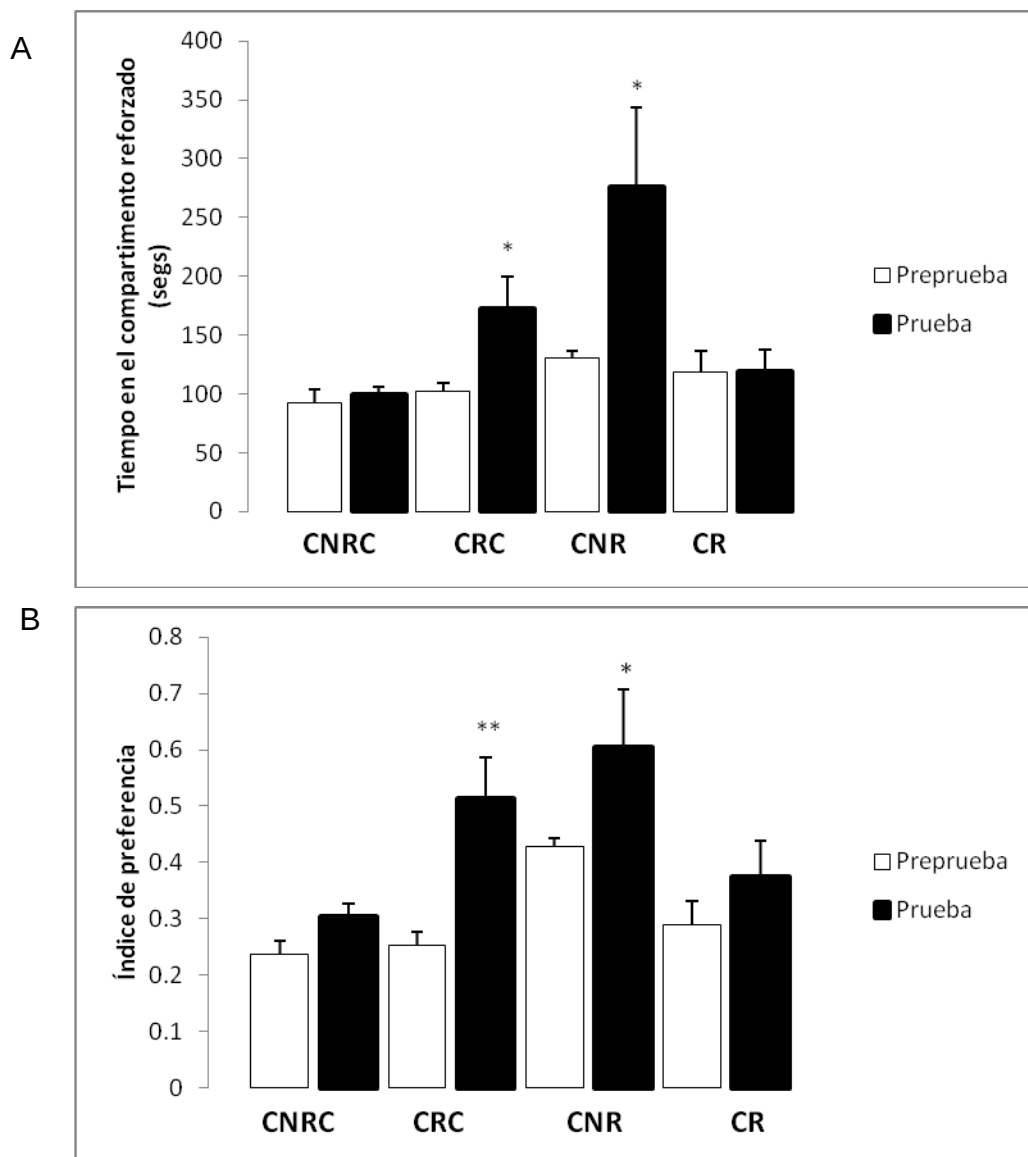


Figura 7. A) Prueba de preferencia de lugar condicionado, donde se muestran los datos graficados del tiempo de permanencia del ratón hembra durante la pre-prueba y la prueba. Se realizó la comparación del grupo cópula no regulada (CNRC), el grupo cópula no regulada (CNR), el grupo de cópula regulada control (CRC) y el grupo de cópula regulada (CR) realizando una comparación entre preprueba y prueba. B) Índice de preferencia de los grupos CNRC, CRC, CNR y CR, donde se muestra que el grupo de CRC tiene una diferencia significativa en relación al grupo CR, mientras que el grupo de CNR es estadísticamente significativo. $p < 0.01^{**}$ y $p < 0.001^{***}$.

6.4. Motivación sexual incentiva en hembras CR y CNR

En este experimento encontramos que las hembras del grupo CR ($p<0.01$) y CNR ($p<0.05$), pasan más tiempo con el macho estímulo que con la hembra sexualmente receptiva (Figura 8).

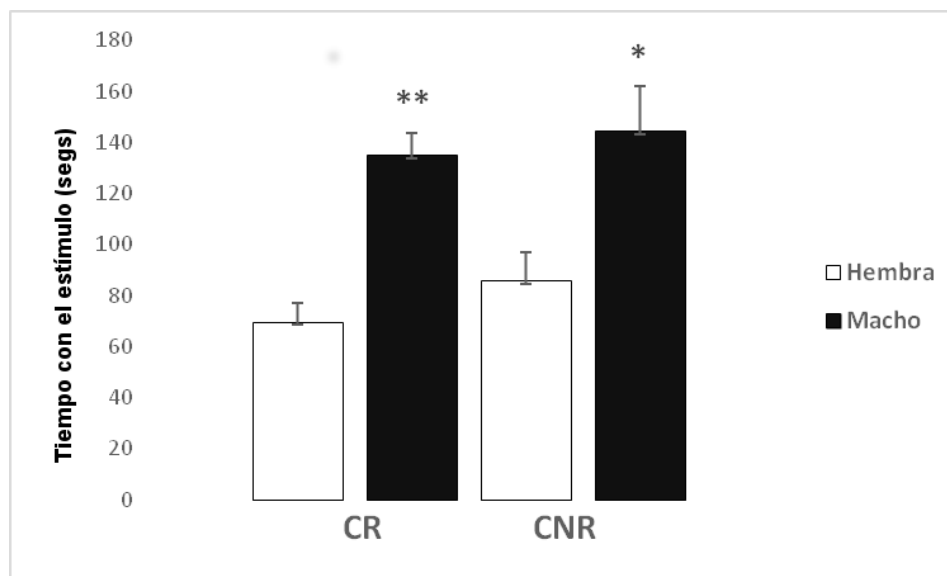


Figura 8. Prueba de MSI en hembras con experiencia sexual en copula regulada (CR) y copula no regulada (CNR), se registra el tiempo que la hembra pasa en la zona incentiva de una hembra y en la zona incentiva del macho. Diferente del tiempo de permanencia con la hembra estímulo * $p<0.05$.

6.5. MSI hembra inexperta vs macho inexperto

En este experimento encontramos que las hembras sexualmente inexpertas permanecieron más tiempo con el macho inexperto (MIN) ($p<0.05$) en comparación con el tiempo que pasan con una hembra inexperta (HIN) (Figura 9).

6.6. MSI macho inexperto vs macho experto

Nuestros datos demuestran que las hembras sexualmente inexpertas prefieren al macho sexualmente inactivo (MI) con respecto al macho sexualmente experto (ME) ($p<0.05$) (Figura10).

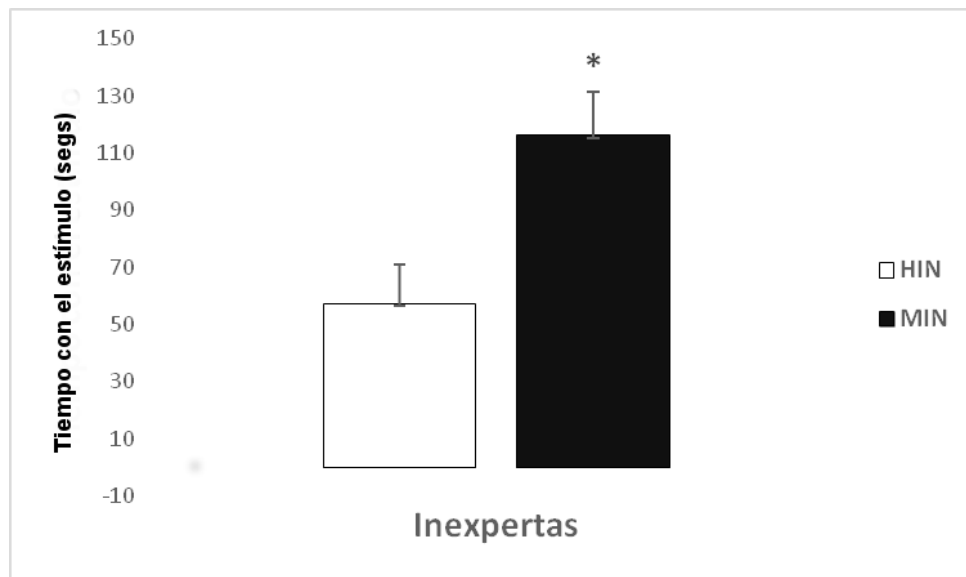


Figura 9. Prueba de MSI en hembras sexualmente inexpertas, se registró el tiempo que la hembra permaneció en la zona incentivativa de una hembra inexperta (HIN) y en la zona incentivativa del macho inexperto (MIN). Hubo una diferencia significativa en MIN (* $p < 0.05$) con respecto al tiempo de permanencia en la zona incentivativa de HIN

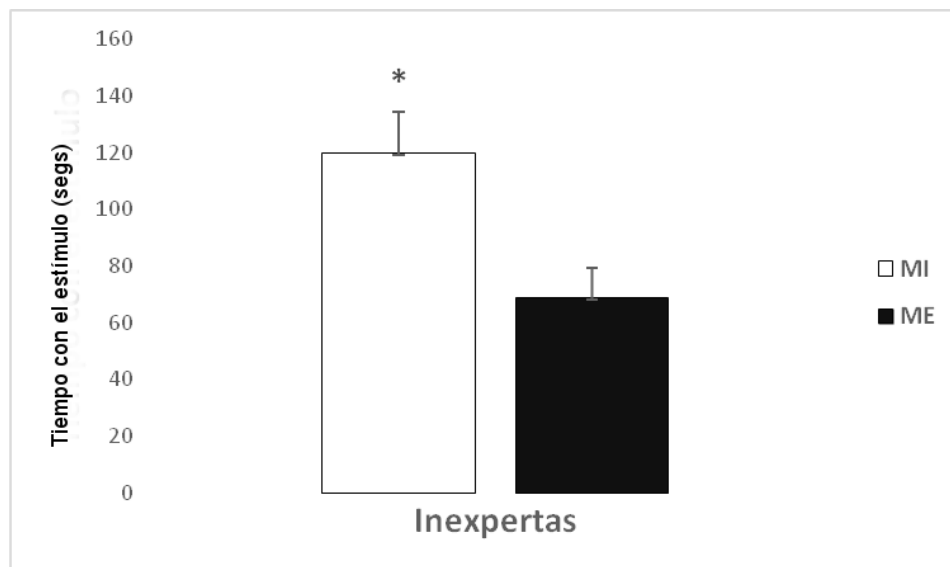


Figura 10. Prueba de MSI en hembras sexualmente inexpertas, se evaluó el tiempo que la hembra permaneció en la zona incentivativa del macho inexperto (MI) y el macho experto (ME). Encontramos que el tiempo de permanencia de la hembra MI estímulo es estadísticamente significativo (* $p < 0.05$), en comparación con el ME estímulo.

Capítulo 7. Discusión y Conclusión

Nuestros datos muestran que no hay diferencias significativas en los parámetros

conductuales de las hembras que copularon en copula no regulada (CNR) y las hembras que regularon la cópula (CR). Por lo que en ambos tipos de cópula las hembras reciben la misma intensidad de estimulación sexual, de esta forma se rechaza la hipótesis 1. Estos datos muestran que a diferencia de la rata, el ratón hembra puede desarrollar estrategias como atacar al macho, realizar vocalizaciones ultrasónicas o sentarse para ocultar la vagina y así evitar la inserción peneana, utilizando estas estrategias pueden regular la estimulación vaginal. De acuerdo a las observaciones realizadas durante el curso del presente trabajo, pudimos observar que el ratón hembra no tiene una conducta proceptiva estereotipada como la rata hembra, sin embargo, concordamos con lo observado por Meyerson y Linström en 1973, así como Garey y colaboradores en el 2002, la lordosis es una buena medida para poder determinar la receptividad de la hembra ante la respuesta de la monta del macho para facilitar la cópula.

En el ratón hembra demostramos que la administración de morfina induce estados afectivos positivos (EAP) los cuales fueron evaluados confiablemente utilizando la prueba de preferencia de lugar condicionada (PLC). Estos datos concuerdan con los estudios recientes realizados por Koek (2014) quien en ratones demostró que es posible inducir PLC.

En las pruebas para evaluar si la cópula induce EAP encontramos que inesperadamente en las hembras que copularon no regulando la interacción sexual (grupo CNR) se les indujo estados afectivos positivos por lo que se observó un cambio de PLC. En las hembras que regularon la copula (grupo CR) esta conducta no generó EAP por lo que las hembras no cambiaron su PLC. Por lo cual se rechaza la Hipótesis 2. Pensamos que estos resultados se deben a que en la CR para impedir que el ratón macho saliera de su compartimento fue entrenado, no obstante los machos al estar en presencia de las hembras receptivas pasaban al compartimento de ellas por lo que los teníamos que retirar manualmente o suavemente tocarlos con un lápiz para regresarlos a su compartimento. Esta intervención probablemente causó estrés a la hembra. De acuerdo a lo reportado por Johansen en el 2008, este grupo utilizó arnés para impedir que el macho saliera de su compartimento. En nuestras condiciones encontramos que los machos se estresaron con el arnés y no copularon. Otra estrategia para realizar la CR es utilizar pantallas de acrílico con un solo agujero para separar dos compartimentos en la caja de copula. En este modelo se requiere entrenar al macho para no pasar al compartimento de la hembra. Por lo que en

estudios futuros evaluaremos si el uso de una barrera de acrílico es una mejor estrategia para evaluar la CR y si en estas condiciones es posible inducir EAP.

Nuestros datos no concuerdan con los estudios en ratas hembra donde consistentemente se ha demostrado que la CR pero no la CNR genera PLC (Martínez & Paredes, 2001; Camacho et al., 2004; Paredes & Fernández-Guasti Alonso, 2008; Arzate et al., 2011).

Otro de los objetivos del presente trabajo fue evaluar si la experiencia sexual en CNR y CR induce motivación sexual incentiva por el macho. Nuestros datos demuestran que ambos tipos de copula inducen motivación sexual por el macho. De esta forma evaluamos si estos resultados se deben a que en el ratón hembra es innata la preferencia por el macho. En los experimentos con hembras sexualmente inexpertas encontramos que estas prefieren al macho que la hembra por lo que la motivación sexual por el macho no requiere de la experiencia sexual.

Resultados similares se han descrito en la rata macho, donde se ha demostrado que los machos sexualmente inexpertos prefieren a las hembras receptivas sobre otros machos o hembras no receptivas (Agmo 2003).

Finalmente evaluamos si las hembras sin experiencia sexual prefieren a un macho experto de un inexperto. Sorprendentemente encontramos que las hembras prefieren al macho inexperto con respecto al experto. En la rata se ha demostrado que las hembras muestra una clara preferencia por el macho en lugar de una hembra, en condiciones en las cuales no hay contacto sexual. Mientras que si la interacción sexual es posible prefieren a un macho castrado sobre un macho sexualmente activo (Meyerson & Lindström, 1973; Broekman et al. 1988; Clark, et al. 2004). Se ha propuesto que esta estrategia es para prevenir sobre estimulación sexual. En nuestros estudios de motivación sexual incentiva no se permite la interacción sexual por lo tanto desconocemos el porqué la hembra prefiera al macho inexperto.

La conducta sexual es un proceso fundamental para los mamíferos. En el ratón hembra esta difiere de otros roedores como la rata en que no despliega conductas

proceptivas. En la rata se ha demostrado que en la CR, la hembra recibe un menor número de intromisiones por lo que la estimulación vaginal es menor con respecto a la CNR. En nuestro estudio demostramos que en el ratón hembra durante la CR y CNR recibe la misma estimulación vaginal y por lo tanto no requiere de regular la interacción sexual para evitar la sobre estimulación. Sin embargo este estudio demuestra que en el ratón hembra, solamente la CNR induce un estado afectivo positivo evaluado por la prueba de preferencia de lugar condicionada. Esto puede deberse a que en la prueba de CR la hembra se pudo estresar al momento de que el macho se paso a su compartimento y fue regresado con la intervención del experimentador.

Determinamos que las hembras con experiencia sexual en CR y CNR tienen una motivación sexual incentiva por el macho en lugar de la hembra. Encontramos que esta preferencia es innata ya que las hembras sin experiencia sexual muestran una clara presencia por el macho sobre la hembra. Finalmente, encontramos que las hembras sin experiencia sexual prefieren a los machos sexualmente inexpertos que a los machos sexualmente expertos.

Perspectivas del trabajo

Como perspectivas a considerar, para un trabajo posterior se pretende comprobar si estos estímulos producen proliferación celular en áreas del órgano vomeronasal, bulbo olfatorio principal y bulbo olfatorio accesorio (neurogénesis) (Arzate, Portillo, Rodríguez, Corona, & Paredes, 2011; Corona et al., 2011)., Así mismo ver si existe neurogénesis en el área del hipocampo, con el fin de observar si hay una relación en la memoria de acuerdo a la percepción del olor del sexo opuesto. Y como una última perspectiva es obtener el número de células que proliferan y el tiempo de su supervivencia en las áreas previamente mencionadas.

Bibliografía citada.

1. Agmo, A. (1999). Sexual motivation--an inquiry into events determining the

- occurrence of sexual behavior. *Behavioural Brain Research*, 105(1), 129-150.
2. Agmo, A. (2003). Unconditioned sexual incentive motivation in the male Norway rat (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology (Washington, D.C.: 1983)*, 117(1), 3-14.
3. Arzate, D. M., Portillo, W., Rodríguez, C., Corona, R., & Paredes, R. G. (2011). Extended paced mating tests induces conditioned place preference without affecting sexual arousal. *Hormones and Behavior*, 59(5), 674-680.
<http://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.08.016>
4. Bakker, J., Van Ophemert, J., & Slob, A. K. (1996). Sexual differentiation of odor and partner preference in the rat. *Physiology & Behavior*, 60(2), 489-494.
5. Baum, M. J., & Kelliher, K. R. (2009). Complementary roles of the main and accessory olfactory systems in mammalian mate recognition. *Annual Review of Physiology*, 71, 141-160.
<http://doi.org/10.1146/annurev.physiol.010908.163137>
6. Beach, H. D. (1957). Morphine addiction in rats. *Canadian Journal of Psychology*, 11(2), 104-112.
7. Broekman, M., de Bruin, M., Smeenk, J., Slob, A. K., & van der Schoot, P. (1988). Partner preference behavior of estrous female rats affected by castration of tethered male incentives. *Hormones and Behavior*, 22(3), 324-337.
8. Camacho, F. J., García-Horsman, P., & Paredes, R. G. (2009). Hormonal and testing conditions for the induction of conditioned place preference by paced mating. *Hormones and Behavior*, 56(4), 410-415.
<http://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.07.007>
9. Camacho, F. J., Portillo, W., Quintero-Enríquez, O., & Paredes, R. G. (2009). Reward value of intromissions and morphine in male rats evaluated by conditioned place preference. *Physiology & Behavior*, 98(5), 602-607.
<http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.09.012>
10. Camacho, F., Sandoval, C., & Paredes, R. G. (2004). Sexual experience and conditioned place preference in male rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 78(3), 419-425.
<http://doi.org/10.1016/j.pbb.2004.04.015>
11. Clark, A. S., Kelton, M. C., Guarraci, F. A., & Clyons, E. Q. (2004). Hormonal status and test condition, but not sexual experience, modulate partner preference in female rats. *Hormones and Behavior*, 45(5), 314-323.
<http://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2003.12.010>
12. Corona, R., Camacho, F. J., García-Horsman, P., Guerrero, A., Ogando, A., & Paredes, R. G. (2011). Different doses of estradiol benzoate induce conditioned place preference after paced mating. *Hormones and Behavior*, 60(3), 264-268.
<http://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2011.05.013>
13. Cunningham, C. L., Dickinson, S. D., Grahame, N. J., Okorn, D. M., & McMullin, C. S. (1999). Genetic differences in cocaine-induced conditioned place preference in mice depend on conditioning trial duration. *Psychopharmacology*, 146(1), 73-80.
14. De Bruijn, M., Broekman, M., & van der Schoot, P. (1988). Sexual interactions between estrous female rats and castrated male rats treated with testosterone propionate or estradiol benzoate. *Physiology & Behavior*, 43(1), 35-39.
15. Domínguez-Salazar, E., Portillo, W., Baum, M. J., Bakker, J., & Paredes, R. G. (2002). Effect of prenatal androgen receptor antagonist or aromatase inhibitor on sexual behavior, partner preference and neuronal Fos responses to estrous female odors in the rat accessory olfactory system. *Physiology*

- & Behavior, 75(3), 337-346.
16. Ellingsen, E., & Agmo, A. (2004). Sexual-incentive motivation and paced sexual behavior in female rats after treatment with drugs modifying dopaminergic neurotransmission. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 77(3), 431-445.
<http://doi.org/10.1016/j.pbb.2003.12.008>
 17. Erskine, M. S. (1989). Solicitation behavior in the estrous female rat: a review. *Hormones and Behavior*, 23(4), 473-502.
 18. Erskine, M. S., & Baum, M. J. (1982). Effects of paced coital stimulation on termination of estrus and brain indoleamine levels in female rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 17(4), 857-861.
 19. Erskine, M. S., Kornberg, E., & Cherry, J. A. (1989). Paced copulation in rats: effects of intromission frequency and duration on luteal activation and estrus length. *Physiology & Behavior*, 45(1), 33-39.
 20. Garey, J., Kow, L.-M., Huynh, W., Ogawa, S., & Pfaff, D. W. (2002). Temporal and spatial quantitation of nesting and mating behaviors among mice housed in a semi-natural environment. *Hormones and Behavior*, 42(3), 294-306.
 21. Gilman, D. P., Mercer, L. F., & Hitt, J. C. (1979). Influence of female copulatory behavior on the induction of pseudopregnancy in the female rat. *Physiology & Behavior*, 22(4), 675-678.
 22. Hetta, J., & Meyerson, B. J. (1978). Sex-specific orientation in the male rat. A methodological study. *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum*, 453, 5-27.
 23. Hull, E. M., & Dominguez, J. M. (2007). Sexual behavior in male rodents. *Hormones and Behavior*, 52(1), 45-55.
<http://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.03.030>
 24. Jemiolo, B., Xie, T. M., & Novotny, M. (1991). Socio-sexual olfactory preference in female mice: attractiveness of synthetic chemosignals. *Physiology & Behavior*, 50(6), 1119-1122.
 25. Johansen, J. A., Clemens, L. G., & Nunez, A. A. (2008). Characterization of copulatory behavior in female mice: evidence for paced mating. *Physiology & Behavior*, 95(3), 425-429.
<http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.07.004>
 26. Koek, W. (2014). Morphine-induced conditioned place preference and effects of morphine pre-exposure in adolescent and adult male C57BL/6J mice. *Psychopharmacology*.
<http://doi.org/10.1007/s00213-014-3695-y>
 27. Martínez, I., & Paredes, R. G. (2001). Only self-paced mating is rewarding in rats of both sexes. *Hormones and Behavior*, 40(4), 510-517.
<http://doi.org/10.1006/hbeh.2001.1712>
 28. Meyerson, B. J., & Lindström, L. H. (1973). Sexual motivation in the female rat. A methodological study applied to the investigation of the effect of estradiol benzoate. *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum*, 389, 1-80.
 29. Moss FA. Study of animal drives. *J Exp Psychol* 1924;7:165– 85.
 30. Paredes, R. G. (2009). Evaluating the neurobiology of sexual reward. *ILAR Journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, 50(1), 15-27.
 31. Paredes, R. G., & Alonso, A. (1997). Sexual behavior regulated (paced) by the female induces conditioned place preference. *Behavioral Neuroscience*, 111(1), 123-128.
 32. Paredes R. G., & Fernández-Guasti, A. (2008). Rewarding properties of mating. *Research Signpost*, 159-170.
 33. Paredes R. G., & Martinez I. (2001). Naloxone blocks places preference conditioning after paced mating in female rats. *Behavioral Neuroscience*,

- 115(6), 1363-1367
34. Portillo, W., & Paredes, R. G. (2003). Sexual and olfactory preference in non-copulating male rats. *Physiology & Behavior*, 80(1), 155-162.
35. Portillo, W., & Paredes, R. G. (2004). Sexual incentive motivation, olfactory preference, and activation of vomeronasal projection by sexually relevant cues in non-copulating and naive male rats. *Hormones & Behavior*, 46(3), 330-340.
36. Portillo, W., & Paredes, R. G. (2009). Conditioned place preference induced by morphine in non-copulating male rats. *Behavioural Brain Research*, 203(2), 308-311.
<http://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.04.037>
37. Scott, J. W., & Pfaff, D. W. (1970). Behavioral and electrophysiological responses of female mice to male urine odors. *Physiology & Behavior*, 5(4), 407-411.
38. Sticht, M., Mitsubata, J., Tucci, M., & Leri, F. (2010). Reacquisition of heroin and cocaine place preference involves a memory consolidation process sensitive to systemic and intra-ventral tegmental area naloxone. *Neurobiology of Learning and Memory*, 93(2), 248-260.
<http://doi.org/10.1016/j.nlm.2009.10.005>
39. Whalen, R. E. (1966). Sexual motivation. *Psychological Review*, 73(2), 151-163.