



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Instituto de Neurobiología

Doctorado en Ciencias Biomédicas

**Efecto de la naloxona en estructuras cerebrales durante el
condicionamiento de preferencia de lugar inducido por la conducta sexual
autorregulada de la rata hembra**

Tesis

que como requisito para obtener el grado de Dr. en Ciencias Biomédicas

P r e s e n t a

Sonia Patricia García Horsman,

Director de tesis:

Dr. Raúl Gerardo Paredes Guerrero

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO GRACIAS AL APOYO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, AL INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA Y A TODOS LOS QUE EN ÉL LABORAN. AL CONCEJO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUE ME OTORGÓ UNA BECA (138738) PARA REALIZAR MIS ESTUDIOS DE POSTGRADO.

Agradecimientos

Quiero agradecer especialmente al Dr. Raúl Paredes Guerrero por su confianza y por su paciencia durante mi estancia en su laboratorio, pero especialmente por contagiarme del goce de hacer ciencia.

A mi jurado:

Dr. Manuel Salas Alvarado, Dr. Oscar González Flores, Dr. Javier Velázquez Moctezuma y a la Dra. Margarita Martínez Gómez por su comentarios y aportes para mejorar esta tesis.

A mis compañeros y amigos del laboratorio especialmente a:

Wendy Portillo

Emilio Domínguez

Arturo Hurtazo

Luci López

Claudia Castillo

Rebeca Corona

Edwards Antonio

Carlos García

Por compartir conmigo su tiempo y sus conocimientos

A Francisco Camacho por su apoyo técnico y por compartir horas de arduo trabajo.

A mis amigos: Claudia, Sol, Juan, José Carmen, Jeans, Alfredo, Carmen, Carlos, Tere, Issell, Juan Pablo y Enrique por su amistad y apoyo a lo largo de mi formación académica.

A Leonor Casanova, María de Lourdes Lara y Carmen Vázquez por su asistencia técnica.

A mi familia especialmente

A mis hijos Pablo, Martín y Andrea por su invaluable apoyo

A DIRZO por su inspiración

**...La verdad científica dura sólo el tiempo que transcurre mientras
no se le encuentren sus defectos, sus errores,
y hay siempre una legión de cazadores
como lobos hambrientos tras la presa.**

Juan García Ramos

Memorias "Pasajes en la senda de mi vida"

INDICE

CAPITULO 1. MOTIVACIÓN SEXUAL	5
__1.1 Neurotransmisores y Neuropeptidos	7
CAPITULO 2. FISIOLÓGÍA DE LA CONDUCTA SEXUAL FEMENINA.	11
__2.1 Ciclo estral de la rata hembra	11
CAPÍTULO 3. COMPORTAMIENTO SEXUAL DE LA HEMBRA.	16
__3.1 Cópula Regulada	19
_____Expresión de la conducta sexual femenina en la rata adulta	19
__3.2 Condicionamiento de preferencia de lugar	21
CAPÍTULO 4. CONTROL NEURAL DE LA CONDUCTA SEXUAL DE LA RATA HEMBRA	24
4.1 Estructuras cerebrales y conducta sexual en la hembra.	27
4.1.1 Hipotálamo ventro medial	27
4.1.2 Área preóptica medial	28
4.1.3 Amígdala	30
4.1.4 Estriado y núcleo accumbens	31
CAPÍTULO 5. TRABAJO DE INVESTIGACIÓN	34
5.1 Planteamiento de problema	34
5.2 Hipótesis	35
5.3 Objetivo General	36
5.4 Objetivos específicos	36
5.5 Método	37
5.5.1 Animales	37
5.5.2 Aparatos	37
5.5.4 Procedimiento experimental	41
5.5.5 Tratamiento hormonal	42
5.5.6 Diseño	42
5.6 EXPERIMENTO 1. CONDUCTA SEXUAL	43
5.6.1 Procedimiento	43
5.7 EXPERIMENTO 2. (CPL)	45

__5.7.1 Procedimiento	45
5.8 EXPERIMENTO 3. MOTIVACIÓN HACIA UN INCENTIVO.	47
__5.8.1 Procedimiento	47
5.9 ANÁLISIS DEL TEJIDO CEREBRAL	48
5.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	49
5.11 RESULTADOS	50
__5.11.1 Análisis de los tejidos	50
__5.11.2 Experimento 1	52
__5.11.3 Experimento 2 (CPL)	53
__5.11.4 Experimento 3	56
BIBLIOGRAFÍA	66

Introducción

En los últimos años se ha despertado un gran interés en el estudio de algunas de las sustancias que son liberadas durante la cópula. Se ha propuesto, por ejemplo, que los péptidos opioides juegan un papel facilitatorio en la regulación de la conducta sexual en roedores. Estudios farmacológicos en los que diferentes opiáceos, son administrados a ratas macho a nivel central y sistémico parecen modificar ciertos aspectos de la cópula. Por ejemplo, se ha observado una reducción de la latencia a la primera eyaculación, así como disminución de la latencia de monta e intromisión (Agmo & Paredes 1988). Otra serie de evidencias sugieren que los opioides liberados durante la cópula inducen un estado afectivo positivo o “placentero” que puede evaluarse por medio del condicionamiento de preferencia de lugar (CPL) ver más adelante. La administración de morfina por vía sistémica o directamente en el área preóptica medial (APM) del hipotálamo anterior, una región cerebral fundamental para la expresión de la conducta sexual masculina, bloquea el CPL inducido por la cópula en machos (Paredes 2003). En las hembras, durante el apareamiento se ha observado que la cópula induce un cambio de preferencia, cuando éstas tienen la posibilidad de regular los contactos con el macho a esto se le conoce como cópula regulada. También se ha demostrado que la administración de naloxona (antagonista opioide) intraperitonealmente bloquea el CPL inducido por la cópula regulada (Paredes & Martinez 2001). Todos estos resultados sugieren que la conducta sexual tanto en machos como en hembras parece estar mediada por opioides.

Por otro lado, en las hembras, poco se conoce sobre las estructuras cerebrales involucradas en el estado afectivo positivo asociado a la conducta sexual femenina. Diferentes autores han descrito que el núcleo ventro-medial del hipotálamo (HVM) juega un papel importante en el control de la conducta sexual femenina (Acosta-Martinez & Etgen 2002a; b; Blaustein & Erskine 2002; Pfaff et al 1994; Yang & Clements 2000). Las lesiones en esta área reducen la conducta de lordosis y alteran el patrón de contacto con el macho disminuyendo el número de aproximaciones hacia el mismo, pero no eliminan la conducta sexual. Se ha demostrado, usando el gen de expresión temprana FOS, que estructuras cerebrales como la amígdala medial (AMG), el hipotálamo ventro-medial (HVM) y el área preóptica medial (APM) se activan después de la cópula regulada.

El objetivo de la presente trabajo fue administrar yoduro de N-metil naloxona, antagonista opioide, en diferentes estructuras cerebrales, y examinar su efecto sobre la conducta sexual y el CPL inducido por la cópula regulada en la rata Wistar hembra. Las áreas a estudiar fueron, el área preóptica medial (APM), hipotálamo ventro-medial (HVM), amígdala medial (AMG), y núcleo accumbens (ACB). En trabajos anteriores, se ha reportado, utilizando las técnicas de hibridación in situ, que estas áreas expresan receptores a opioides (Mansour et al 1995a; Mansour et al 1995b).

ABSTRACT

Female paced sexual behavior can induce a positive affect and develop a clear conditioned place preference (CPP). It has been suggested that endogenous opioids are involved in the rewarding aspects of female sexual behavior. Systemic administration of the opioid antagonist naloxone blocks CPP induced by paced mating in female rats. Different neuronal structures such as the medial preoptic area (MPOA), the ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH), the amygdala (Me), and nucleus accumbens (Acb), have been implicated in the control of female sexual behavior. The present experiments evaluated the effects of intracranial administration of naloxone methiodide into the MPOA, VMH, Me, or Acb on proceptive and receptive behaviors and conditioned place preference induced by paced mating in Wistar female rats. Regardless of the site of infusion 5 μ g of naloxone did not affect any of the sexual behavior parameters measured during copulation. When CPP was evaluated, the groups infused with naloxone into the MPOA, the VMH, and the Me after paced mating did not develop place preference. Only the group infused with naloxone in the Acb and the control groups did so. These results demonstrate that intracerebral administration of the opioid antagonist naloxone into the MPOA, VMH, and Me blocks the affective aspects of paced mating in female rats suggesting that these structures play an important role in processing sexual input and that the opioid system mediates the rewarding aspects of the positive affect induced by paced mating and in female rats. Furthermore, these data contribute to the understanding of the cerebral circuits and the physiology that support such an important behavior to survival.

RESUMEN

La conducta regulada de la rata hembra induce un estado afectivo positivo de suficiente intensidad para inducir un cambio de preferencia de lugar (CPL). Se ha sugerido que los péptidos opioides podrían estar involucrados en los aspectos placenteros de la cópula. La administración sistémica (ip) de naloxona, un antagonista opioide bloquea el CPL inducido por la cópula regulada en la rata hembra. Diferentes estructuras como el área preóptica medial (APM), el núcleo ventro medial del hipotálamo (HVM), la amígdala (AMG) y el núcleo accumbens (ACB), han sido asociadas al control de la conducta sexual femenina. Los experimentos realizados en el presente trabajo, evalúan los efectos de la administración intracraneal de N -metil naloxona en el APM, HVM, AMG o núcleo accumbens (ACB), en las conductas preceptivas y receptoras durante la cópula así como su efecto sobre el condicionamiento de preferencia de lugar inducido por la cópula regulada. Independientemente del sitio de la infusión, la dosis de 5 µg de naloxona no afectó ninguno de los parámetros evaluados durante la cópula. Los resultados del condicionamiento de preferencia de lugar mostraron que la administración de naloxona en el APM, en el HVM y en la AMG bloquea los efectos de la cópula regulada. Solamente los grupos a los que se les administró el fármaco en el ACB así como a los grupos control cambiaron de preferencia. Estos resultados muestran que la administración intracerebral de naloxona, un antagonista opioide, en el APM, HVM y en la AMG bloquean los efectos inducidos por la cópula regulada, sugiriendo que estas estructuras juegan un papel importante en los estados afectivo positivos de la conducta sexual regulada en la rata hembra. Este trabajo contribuye de manera importante a entender los circuitos

cerebrales y la fisiología de una conducta fundamental para la supervivencia de la especie.

Capítulo 5. Trabajo de Investigación

5.1 Planteamiento de problema

Los componentes motivacionales de la cópula en la hembra han sido poco estudiados. Estudios previos muestran que los opioides participan en la conducta sexual de los machos (Agmo & Berenfeld 1990; Agmo & Gomez 1991; 1993; Agmo et al 1994; Agmo & Paredes 1988) y en el estado afectivo positivo inducido por la CR en hembras (Paredes & Martinez 2001). A pesar del gran esfuerzo en identificar las estructuras que se activan durante la estimulación sexual en la hembra, poco se conoce en relación de los eventos neurales que traducen la estimulación sexual en el estado afectivo placentero inducido por la cópula regulada. Dada la complejidad de la interacción entre los diversos estímulos sensorio motores y procesos motivacionales que participan en el apareamiento es claro que diversas estructuras cerebrales se encuentran involucradas. El propósito del presente trabajo es conocer la participación de diferentes estructuras cerebrales en los estados afectivos positivos de la copula en la hembra. Para el logro de este objetivo se administrará el antagonista opioide naloxona, en el APM, HVM, ACB o AMG evaluando su efecto en el estado afectivo positivo inducido por la cópula regulada utilizando el CPL. Esto nos permitirá identificar el circuito neuronal que se activa durante la copula en las hembras y que contribuye al estado afectivo positivo de la copula. También nos permitirá identificar si estas estructuras son diferentes a las que se activan en los machos o si existe un circuito general de reforzamiento sexual en ambos sexos.

Capítulo 1. Motivación sexual

El proceso por el cual una hembra busca tener contacto sexual con un macho se conoce como motivación sexual. El primer análisis sistemático de la motivación sexual fue realizado por Beach en 1956 (Beach 1956). Este autor postuló que existe un mecanismo de excitación sexual que activa la conducta de cópula. Posteriormente, Hardy en 1973 describió a la motivación sexual como motivación apetitiva, también conocida como motivación a un incentivo sexual (Agmo 1999; Hardy & DeBold 1973). Así, en la rata hembra en estro, la presencia del macho le provoca una conducta de aproximación y retirada la cual lo estimula para que se realice el patrón conductual completo de la cópula.

Estudios realizados en ambientes semi-naturales muestran que las hembras realizan una variedad de patrones de solicitud para atraer al macho e incitar la cópula (Anisko et al 1978; McClintock & Adler 1978; McClintock & Anisko 1982). Posteriormente se realizaron observaciones bajo estándares controlados de laboratorio, y se evaluó el despliegue conductual y la complejidad de los patrones de solicitud que muestra una hembra en estro. Se observó que la hembra influye de manera determinante en el patrón de apareamiento ya que produce contactos periódicos e intermitentes de solicitud hacia el macho sexualmente activo.

Estas conductas, además de generar cambios neuroendocrinos, inducen a su vez cambios neuroquímicos que aseguran el éxito reproductivo.

Los aspectos motivacionales de la conducta sexual se han estudiado utilizando una gran variedad de métodos, entre los cuales se encuentra el paradigma de CPL. Este método de aprendizaje asociativo consiste en

relacionar claves medioambientales, tales como las visuales y olfatorias con el efecto inducido por un tratamiento que produce un estado fisiológico específico. Este estado puede tener consecuencias tanto positivas como negativas que dependen del tratamiento y que puede provocar un incremento o decremento en el tiempo que el sujeto pasa en el compartimiento que originalmente no prefería. Utilizando este paradigma, se ha demostrado que la conducta sexual en la rata hembra induce un estado afectivo-positivo, cuando ésta tiene la posibilidad de controlar los contactos físicos o interacciones sexuales con el macho. Es decir, esta conducta produce un estado fisiológico de suficiente intensidad y duración que puede ser asociado a las características físicas de la caja de CPL e inducir un cambio de preferencia. A esta conducta en donde la hembra tiene el control sobre los contactos físicos con el macho, se le conoce como "cópula regulada" (Beach 1976; Blaustein & Erskine 2002; Erskine 1989). Esta conducta, está asociada a la habilidad de la hembra para discriminar diferentes grados de intensidad de estimulación sexual. Se ha observado que las hembras en estro, realizan este patrón de acercamientos y retirada hacia el macho con el propósito de reducir los estados aversivos que produce la intensa estimulación vaginal por la intromisión peneana. Cuando la hembra se somete a numerosas montas, intromisiones y eyaculaciones, los intervalos de contacto con el macho se incrementan considerablemente, se disminuye la probabilidad que la hembra despliegue el reflejo de lordosis así como la intensidad del mismo. Aparentemente, la intensidad de la estimulación que la hembra recibe durante la cópula determina la frecuencia de acercamiento hacia el macho y a medida que la estimulación es mayor se incrementa el tiempo para que la hembra

reanude la cópula. Esto es, las latencias de regreso después de que la hembra recibió una eyaculación son mayores que después de una intromisión, y éstas mayores que las latencias de regreso después de una monta (Erskine 1989; Pfaff et al 2002).

1.1 Neurotransmisores y Neuropéptidos

Otro aspecto importante en el estudio de los componentes fisiológicos involucrados durante la cópula de hembras de varias especies de mamíferos, es el estudio de los neurotransmisores y neuropéptidos que participan durante la conducta sexual. Diferentes péptidos son liberados al espacio sináptico durante la cópula, entre ellos se encuentran, la oxitocina, la dopamina, la serotonina, las catecolaminas y los péptidos opioides;(Agmo & Berenfeld 1990; Guarraci & Clark 2003; Knobil & Neill 1994b; Kudwa et al 2005; McCarthy et al 1994; Mehrara & Baum 1990; Mermelstein & Becker 1995; Paredes et al 2000; Paredes & Martinez 2001; Pfaus et al 1995; Pfaus et al 2001; Yang & Voogt 2001). Es necesario aclarar aquí, que la conducta sexual femenina no solo es el resultado de la acción de las hormonas gonadales, sino que hay una gran variedad de otros compuestos y moléculas y una multitud de vías de señalización que activan segundos y terceros mensajeros dentro de la neuronas, que le agregan otros niveles de complejidad a los mecanismos involucrados en la conducta sexual femenina. Estos compuestos incluyen nucleótidos como adenosinas y guanosinas, prostaglandinas, oxido nítrico entre otros. Por ejemplo la vía de señalización de las proteínas cinasa de acción mitogénica (MPAK) que parece amplificar e integrar señales de otros

estímulos extracelulares para activar o inhibir la conducta sexual femenina, cómo estos múltiples mecanismos coexisten y aseguran la respuesta de la neurona a la señal correcta para controlar una respuesta genómica y conductual tan específica, permanece aún sin respuesta (Blaustein 2007; Mani 2008). De igual manera, no ha sido posible esclarecer tampoco el papel que juega el sistema de neurotransmisores involucrados en el estado afectivo positivo o placentero inducido por la cópula. A pesar de que se ha propuesto que la dopamina podría ser un buen candidato involucrado en los procesos reforzantes o placenteros de la cópula (Hull et al 1999; Kudwa et al 2005; Mermelstein & Becker 1995; Pfaus et al 2001) pero no participa de manera importante en los aspectos motivacionales de la misma (Agmo & Fernandez 1989; Garcia Horsman & Paredes 2004; Paredes & Agmo 2004).

Para poder entender que los receptores a hormonas esteroides pueden ser activados por otros neurotransmisores para dar lugar a la conducta sexual, es necesario considerar el rol potencial de otras rutas de activación como es el caso de la dopamina. Existen grandes controversias sobre el significado funcional de la dopamina durante la cópula, y esto se debe en gran medida, a que este neurotransmisor activa vías de señalización de segundos mensajeros que activan indirectamente a los receptores a esteroides. Estudios farmacológicos han mostrado que agonistas dopaminérgicos específicos D_1 administrados intracerebralmente facilitan la conducta sexual particularmente en la expresión de las conductas motoras como el reflejo de lordosis. Este efecto puede ser bloqueado tanto por antagonistas a progesterona como antagonistas D_1 lo que sugiere la acción de la dopamina a través de los receptores de progesterona como mediadores transcripcional de la vía iniciada

por dopamina en la conducta sexual (Blaustein 2007; Mani 2001; Mani et al 2000; Mani et al 2006). De cualquier forma no se ha demostrado la participación de la dopamina en el efecto afectivo positivo de la cópula regulada.

Por otro lado, se conoce que los péptidos opioides juegan un papel crucial en los mecanismos de reforzamiento (Agmo et al 1993; Agmo & Gomez 1993; Agmo et al 1994; Agmo & Paredes 1988). Estudios realizados en la rata macho, se ha propuesto que durante la eyaculación, se liberan opioides endógenos que participan en las propiedades placenteras de dicho evento (Agmo & Berenfeld 1990). Además, tanto la administración sistémica como intracerebral de antagonistas opioidérgicos, bloquean la preferencia de lugar inducida por la eyaculación (Agmo & Berenfeld 1990). Por otro lado, se conoce que la administración sistémica de naloxona, antagonistas de opioides, bloquea el CPL inducido por la cópula regulada de las hembras (Paredes & Martinez 2001). Sin embargo, no se conocen las estructuras o los circuitos neuronales, ni los mecanismos por los cuales el cerebro asimila e interpreta los efectos afectivos positivos inducidos por la cópula. Los trabajos enfocados al estudio de los circuitos neurales involucrados en el procesamiento de los estímulos durante la cópula regulada, han demostrado que utilizando la expresión de genes tempranos se observa incremento en el número de células inmunoreactivas a FOS. Así en diversas estructuras como en el área preóptica medial, el núcleo ventro-medial del hipotálamo, el núcleo lecho de la estría terminal, y la amígdala medial se observa este inmunomarcaje (Erskine 1993; Erskine & Hanrahan 1997). Es importante señalar que, a pesar de que durante las últimas décadas se ha estudiado la relación neuroanatómica y los

mecanismos relacionados a las consecuencias neuroendocrinas y conductuales de la estimulación vagino cervical, se desconoce si las mismas estructuras participan también en el circuito involucrado en los aspectos placenteros inducidos por la cópula regulada.

Con base a lo anterior, el presente trabajo pretende identificar algunas de las estructuras cerebrales que participan en la motivación sexual incentiva y en los estados placenteros asociados a la cópula regulada.

Capítulo 2. Fisiología de la conducta sexual femenina.

2.1 Ciclo estral de la rata hembra

En la mayoría de las especies la información genética es quien determina que un individuo sea hembra o macho al actuar tanto a nivel gonadal como a nivel del sistema nervioso central. A medida que el individuo se desarrolla, las hormonas secretadas por las gónadas (ya sea antes o después del nacimiento, dependiendo de la especie de mamíferos) producen “efectos organizacionales” que inducen una diferenciación, crecimiento y supervivencia celular, dando como resultado la masculinización o feminización y su manifestación conductual ya en el animal adulto (Knobil & Neill 1994a).

Como en la mayoría de las especies de mamíferos, en la rata hembra se presentan períodos de actividad sexual cíclicos, es decir, períodos de receptividad que se presentan alternadamente con períodos de no-actividad sexual, *estro* y *anestro* respectivamente (Morali & Beyer 1979). Estos períodos se conocen como ciclo estral y obedecen a cambios en la función ovárica inducidos por el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. Durante el ciclo estral, se secretan diferentes hormonas hipofisarias como la luteinizante y la folículo estimulante que preparan al sistema reproductor para su fertilización (Figura 1). La liberación de estradiol seguido de progesterona, desde los ovarios, inducen la expresión de la conducta de *estro* si la hembra se encuentra frente a un

macho mostrará diferentes patrones conductuales que darán lugar al apareamiento (Blaustein & Erskine 2002; Pfaff et al 2002).

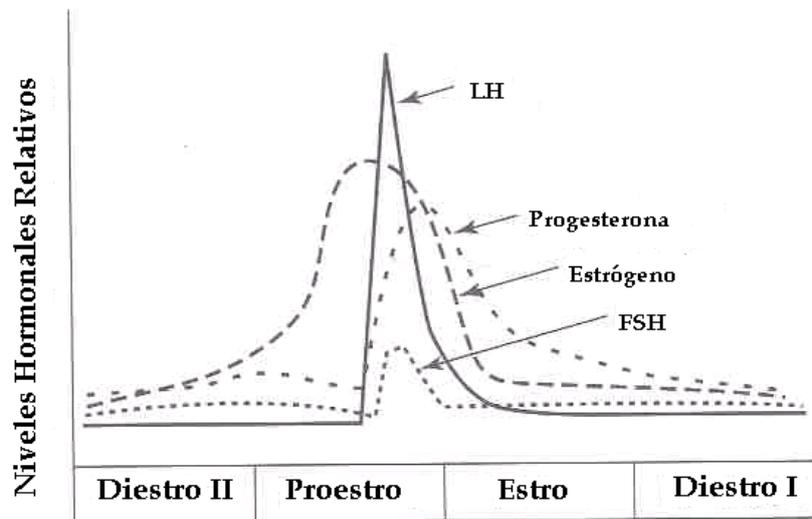


Figura 1. La acción secuencial de estradiol y progesterona provoca el comportamiento de lordosis que se presenta de manera más intensa durante el proestro tardío y principios del estro. (Modificado de (Schumacher et al 1999).

El ciclo estral en la rata es muy corto cuatro o cinco días aproximadamente. Durante este ciclo se presentan cuatro fases: *metaestro o diestro I*, *diestro II*, *proestro* y *estro*. Las fluctuaciones en el comportamiento sexual de la rata hembra dependen de las variaciones de su función ovárica. Se conoce que el *estro* es la fase de mayor actividad sexual, mientras que el *diestro I* es la etapa en donde la hembra muestra mayor rechazo sexual, las otras dos fases son de transición (Morali & Beyer 1979). Los cambios físicos son evidentes, durante el período pre-ovulatorio hay crecimiento de los folículos ováricos que corresponde al aumento en la secreción de estrógenos. Sin embargo, durante el *diestro (I)* no hay importantes variaciones en los niveles de estradiol, sino hasta el *diestro II* en donde gradualmente se comienza a incrementar. A

medida que el *proestro* transcurre, el la secreción de estradiol se incrementa hasta alcanzar su máximo nivel de concentración hacia la mitad del *proestro* y disminuye significativamente al inicio del *estro*. Cuando el estradiol ha alcanzado su pico máximo se presenta incremento de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), liberada desde el hipotálamo hacia la eminencia media. Esta hormona llega a través del sistema portal hipofisiario por vía sanguínea hasta la pituitaria, incrementando la secreción de la hormona luteinizante (LH) que llega a su nivel de concentración más alto al final del *proestro* (Knobil & Neill 1994b). La secreción de progesterona proviene por un lado de las células de la teca interna y posteriormente de las células de la granulosas o cuerpo amarillo que se forma después de la ovulación, por lo tanto, la primera secreción se produce en la tarde-noche del *proestro* y la otra al final del *metaestro* en el cual esta hormona se mantiene en niveles altos si es que hay fertilización. El incremento secuencial del estradiol y la progesterona provocan que se despliegue la conducta sexual femenina (con una duración entre 13 y 15 horas), coincidiendo con el período de ovulación. En la Figura 2 se muestran los niveles circulantes de progesterona, prolactina, estradiol, LH, y FSH en plasma obtenidos cada dos horas durante cada día en las diferentes fases del ciclo reproductor de la rata hembra (Knobil & Neill 1994b).

Cuando la concentración de estrógenos en el plasma sanguíneo comienza a decrecer, el ciclo ha llegado a la última fase, el *estro* (Morali & Beyer 1979). El aumento en la secreción de progesterona coincide con el inicio de la receptividad conductual en la rata y tiene una duración de 13 a 15 horas (Figuras 1 y 2).

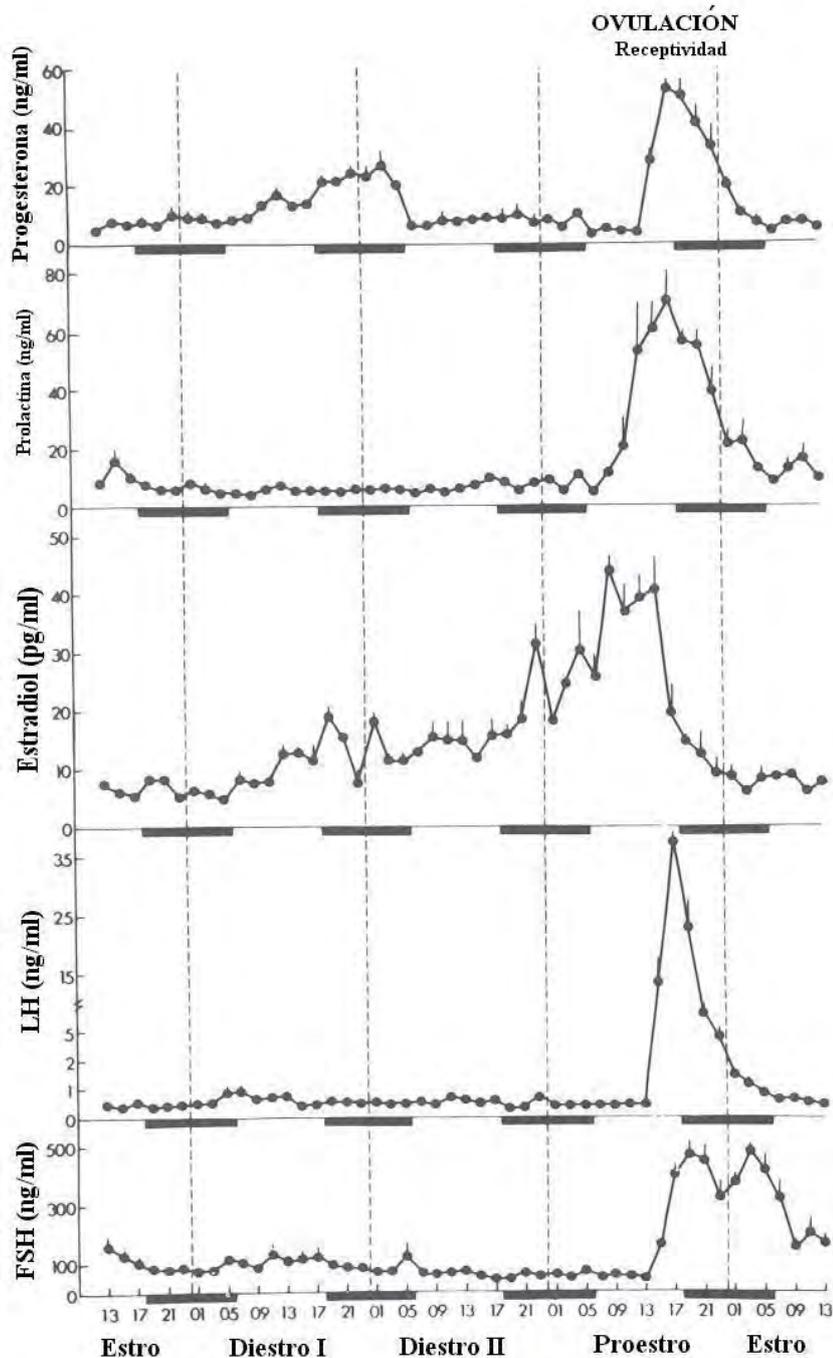


Figura 2. Patrón de concentración hormonal en el plasma a intervalos de 2-horas durante el ciclo estral de la ratona. En la gráfica se indica el período en el cual ocurre la receptividad sexual y la ovulación. Las barras negras representan el intervalo de oscuridad en un ciclo de 12-12 h. (Modificada de Freeman en Knobil y Neill, 1994).

Cuando una hembra es ovariectomizada (OVX), los ciclos hormonales desaparecen y el animal permanece en diestro I continuo. Sin embargo, la

administración secuencial de estradiol y progesterona reactivarán la aparición de la conducta de estro (Knobil 1994). El ciclo hormonal se encuentra estrechamente relacionado con los cambios en el epitelio del tracto reproductivo. Por ejemplo, la citología de estas fases puede ser identificada por medio de la descamación celular que sufre la vagina y que se puede visualizar a través de la obtención de frotis vaginales. Los efectos de los estrógenos sobre la mucosa vaginal son mucho más pronunciados que los de la progesterona ya que la concentración de estrógenos circulante es mayor durante el proestro; mientras que en el estro existe una mayor proliferación y exfoliación de las células (Figura 3 A). Por otro lado, durante el proestro o anestro se presentan mayor número de leucocitos y células anucleadas Figura 3 (B).

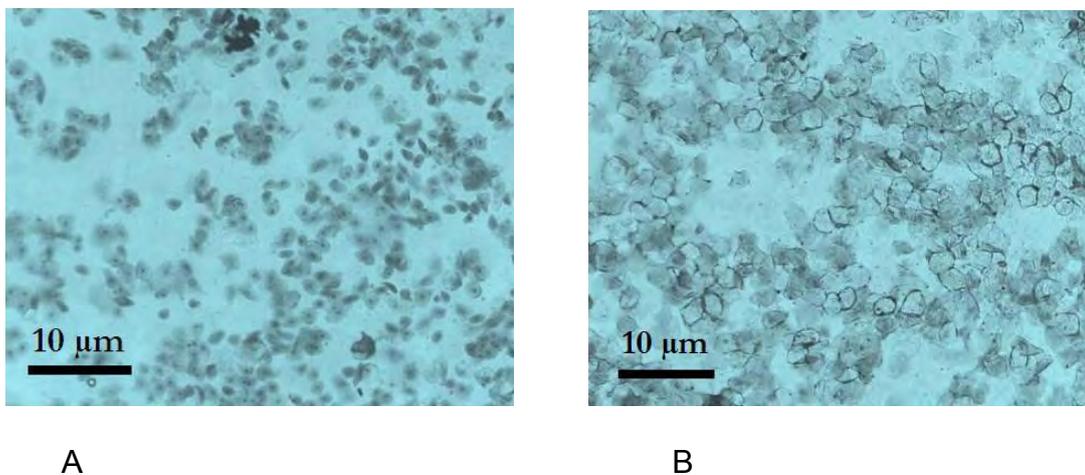


Figura 3. Fotomicrografías del frotis vaginal, de una rata OVX En (A) en diestro o anestro como puede observarse la flecha muestra las células queratinizadas de núcleo bien definido y en (B) en estro, células cornificadas con núcleos picnóticos como se indica con la flecha.

Capítulo 3. Comportamiento sexual de la hembra.

La conducta sexual de la hembra se caracteriza por tres componentes principales: 1) atractividad, 2) proceptividad o conducta de solicitud y 3) receptividad, caracterizada por el reflejo de lordosis. A través de estas conductas la hembra mantiene proximidad con el macho e incrementa la probabilidad de una interacción sexual (Beach 1976; Deswurry 1968; Morali & Beyer 1979).

La atractividad se define como la habilidad que tiene una hembra para atraer a un macho con el fin de llevar a cabo la cópula (Beach 1976), e incluye diferentes aspectos adaptativos. Dichos aspectos van desde el acercamiento al macho, hasta el apareamiento a través de señales sensoriales. Así, el macho identifica tanto el sexo, como el estado reproductivo en que se encuentra la hembra, con la finalidad de que éste oriente y sincronice sus respuestas coitales de intromisión y emisión de esperma (Beach 1976).

La proceptividad o conducta de solicitud, se refiere a todas aquellas conductas estereotipadas que realiza la hembra y que son dirigidas al macho para invitarlo a copular con ella. Estas conductas incluyen: a) orejeo, movimiento de alta frecuencia de la cabeza que provoca que las orejas también se muevan; b) brincoteo, la hembra realiza pequeños brincos con sus cuatro patas; c) carreras cortas en forma de zig-zag que terminan abruptamente con una postura agazapada de la hembra d) movimientos de acercamiento y retirada hacia el macho y e) emisión de sonidos ultrasónicos (Beach 1976; Erskine 1989). La receptividad se refiere a la postura del reflejo de lordosis que se produce en respuesta a la monta que el macho le realiza a la hembra. La

lordosis se define como la dorsiflexión de la columna dorsolumbar con elevación de la cabeza y el tren posterior, seguida de un movimiento lateral de la cola para que facilite la intromisión peneana (Beach 1976; McClintock & Adler 1978). La probabilidad de que la lordosis se presente, está relacionada directamente con los niveles hormonales de estradiol y progesterona provenientes de las gónadas. Esto sucede durante el pro-estro tardío e inicios del estro.

La evaluación de la conducta sexual femenina en la rata se ha llevado a cabo por medio de la utilización del cociente de lordosis (CL), el cual se obtienen al contar el número de veces que la hembra despliega la conducta de lordosis dividido por el número de montas y multiplicado por cien. Por lo tanto, un coeficiente alto corresponde a un alto grado de receptividad, y viceversa (Beach 1976). Otra forma de evaluar la receptividad es cuantificando la intensidad de la lordosis. Esta cuantificación fue inicialmente propuesta por Hardy y DeBold (Hardy & DeBold 1972) a través de sumar el grado de arqueamiento de la columna vertebral durante la expresión de la lordosis. El grado de dorsiflexión va desde 0, cuando no la hembra no despliega lordosis, 1 si el arqueamiento es leve y 2 ó 3 si el arqueamiento de la columna es pronunciado (ver Figura 4). Por lo tanto, la sumatoria de todos los valores obtenidos en cada lordosis individual, dividido por el número de montas y multiplicado por 10, será lo que corresponde a la intensidad media de lordosis.

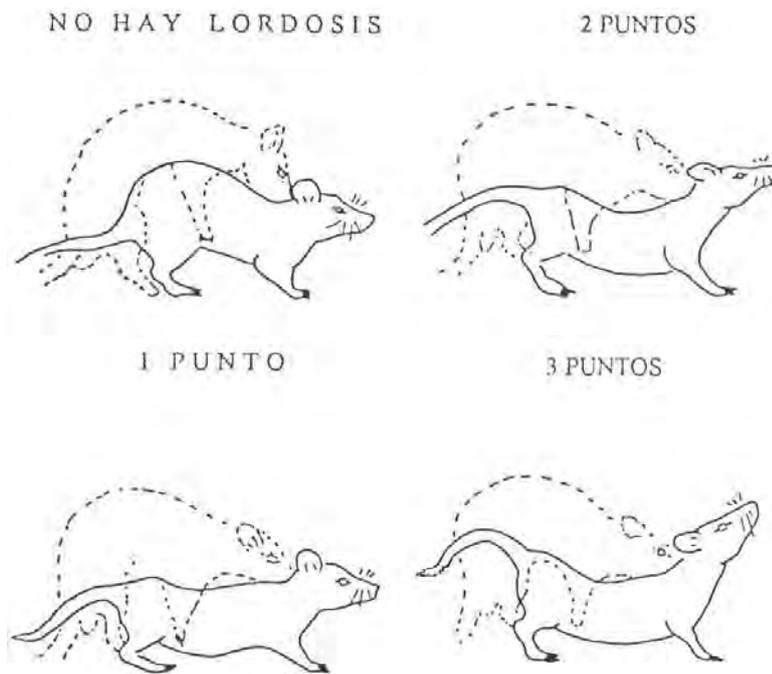


Figura 4. Cuantificación del grado de lordosis (Hardy & DeBold 1972).

En conclusión, el repertorio conductual que la hembra desplegará durante el estro, dependerá principalmente de la interacción sinérgica de las hormonas gonadales (estrógeno y progesterona), de las características del medioambiente en donde se realice (Beach 1976; Brandling-Bennett et al 1999; Delville 1991; Fadem et al 1979; Komisaruk 1974; Mani et al 1994; Menard & Dohanich 1994; Whalen 1974), y de su experiencia. Además, la compleja gama de conductas que realiza la hembra para atraer al macho juega un papel importante para la determinación del tipo y la cantidad de estimulación que la hembra recibe durante el apareamiento. Consecuentemente, la conducta que la hembra realice será parte importante de las conductas de interacción subsecuentes.

3.1 Cópula Regulada

Expresión de la conducta sexual femenina en la rata adulta

En condiciones semi-naturales se ha observado que la conducta de cortejo es el resultado de la participación de ambos sexos. Estudios clásicos realizados por el grupo de Martha McClintock demostraron que tanto la hembra como el macho tienen, un papel muy activo y ambos regulan la cópula controlando el número de contactos entre ellos durante la interacción sexual (McClintock & Adler 1978; McClintock & Anisko 1982; McClintock et al 1982). En el caso de la hembra, ésta realiza acercamientos y retiradas consecutivamente del macho hasta que llega a ser estimulada con montas, intromisiones y eventuales eyaculaciones. Sin embargo, si la hembra permite recibir una intensa y prolongada estimulación vagino-cervical, las conductas proceptivas y la lordosis disminuyen significativamente al punto en que la hembra comienza a rechazar al macho. Si la hembra tiene la posibilidad de mantenerse alejada del macho, lo siguiente ocurre dependiendo de la estimulación que la hembra recibe durante el apareamiento, los intervalos de tiempo entre los contactos con el macho serán cortos si recibe un a monta, más largos si recibe una intromisión y mucho más prolongados si recibe una eyaculación. A esta capacidad de espaciar la estimulación sexual por parte de la hembra se le conoce como cópula regulada o "pacing". El número óptimo de intromisiones y el intervalo entre las mismas requiere de un patrón específico para inducir un estado de preñez (Erskine 1989; Erskine et al 1989). Experimentos realizados en el laboratorio, se ha demostrado que cuando los animales tienen la posibilidad de regular los contactos con la pareja, por

ejemplo, en el caso de las hembras, prefieren períodos más largos entre las intromisiones que los machos, mientras que los machos prefieren intromisiones cortas y regulares que les lleven rápido a la eyaculación (Erskine et al 1989).

En los últimos años se ha puesto particular interés al estudio de la cópula regulada y las consecuencias neuroendocrinas que ésta desencadena. Se ha demostrado, por ejemplo, que cuando la hembra regula la cópula, el intervalo inter contacto aumenta progresivamente, siendo los intervalos entre monta más cortos que los de las intromisiones y que los de la eyaculación. Las hembras con disección de los nervios pudendo y pélvico son incapaces de regular la cópula (Erskine 1992). También se ha descrito, desde el punto de vista neuroendocrino, que las hembras que son capaces de regular la cópula requieren menos intromisiones para quedar preñadas incrementándose la intensidad de la estimulación vagino-cervical provocando que las intromisiones sean más efectivas. Además, se ha demostrado que la cópula regulada reduce el número de intromisiones que se requieren para transportar al esperma a través del cervix y así desencadenar el reflejo neuroendocrino involucrado en producir la preñez o pseudo-preñez (Erskine et al 1989).

Con base a estudios anteriores (Bermant 1961; Erskine 1989; Erskine et al 1989; Peirce & Nuttall 1961a; b; Pfaus 1999b; Pfaus et al 1999) en nuestro laboratorio hemos implementado cajas especiales en donde las hembras pueden regular el número de contactos que reciben del macho (ver en el método el apartado de Aparatos). Las cajas son de acrílico y poseen dos compartimientos divididos por una placa acrílica con un orificio central en la parte inferior. El propósito de este orificio es permitir que solo la hembra, por su tamaño, sea capaz de pasar de un lugar a otro sin que el macho pueda seguirla

(ver sección de aparatos Figura 7). De esta manera la hembra es quien controla la estimulación sexual proveniente del macho. Además, en nuestros experimentos combinamos cópula regulada con el método de CPL (ver la sección anterior) que nos permite evaluar los efectos fisiológicos que induce la cópula.

3.2 Condicionamiento de preferencia de lugar

Existe tanto el método de aprendizaje clásico como el operante para evaluar los aspectos motivacionales de diferentes conductas, incluyendo la conducta sexual (Agmo & Berenfeld 1990; Bermant & Westbrook 1966; Coopersmith et al 1996; Gilman & Westbrook 1978; Hill & Thomas 1973; Paredes & Vazquez 1999; Peirce & Nuttall 1961b; Pfaus 1999a; Pfaus et al 2000; Pfaus et al 1999). Uno de los más utilizados ha sido el condicionamiento de preferencia de lugar. Este método es útil para estudiar los aspectos tanto reforzantes como aversivos de algunos fármacos, así como de diferentes aspectos de la cópula regulada (Agmo & Gomez 1991; Camacho et al 2004; Coria-Avila et al 2008; Fletcher et al 1993; Garcia Horsman & Paredes 2004; Gonzalez-Flores et al 2004; Hasenohrl et al 1989; Manzanedo et al 2001; Meisel & Joppa 1994; Paredes & Martinez 2001). El CPL se deriva del aprendizaje asociativo que permite evaluar los efectos de un determinado tratamiento asociándolos a las diferentes señales sensoriales (características físicas) de uno de los compartimientos de la caja de preferencia. De tal forma, que un animal que ha asociado el efecto afectivo positivo de un fármaco o un tratamiento, a un lugar específico, permanecerá más tiempo en el mismo. Así, se ha demostrado que

la conducta sexual induce un estado afectivo positivo o placentero. Ambos, hembras y machos, después del CPL permanecen más tiempo en el compartimiento asociado a la cópula (Agmo & Gomez 1991; Garcia Horsman & Paredes 2004; Paredes & Alonso 1997).

Experimentos realizados por nuestro grupo de investigación, han demostrado que ratas ovariectomizadas sexualmente inexpertas e inyectadas con benzoato de estradiol y progesterona, desarrollan un CPL cuando se les permite regular la cópula. Por el contrario, hembras que no regulan la cópula no modifican su preferencia (Garcia Horsman & Paredes 2004; Martinez & Paredes 2001; Paredes & Alonso 1997). Además, se ha demostrado que hembras que regulan la cópula necesitan de 10 a 15 intromisiones sin eyaculación para presentar un CPL (Paredes & Vazquez 1999). Existen datos que muestran que los péptidos opioides participan en la regulación de la conducta sexual tanto en ratas hembra como en machos (Agmo & Paredes 1988; Mehrara & Baum 1990; Miller & Baum 1987). Por ejemplo, los opioides endógenos liberados durante la cópula facilitan la eyaculación en el macho, lo que genera reducción en el número de intromisiones en la siguiente serie copulatoria, favoreciendo los efectos positivos del apareamiento (Agmo & Berenfeld 1990; Agmo & Paredes 1988). Además, utilizando el CPL se ha demostrado que la cópula induce un estado afectivo positivo, y que éste puede ser bloqueado por la naloxona (antagonista opioide) (Agmo & Gomez 1993; Mehrara & Baum 1990; Miller & Baum 1987), sugiriendo la participación del sistema opioidérgico durante la conducta sexual y contribuyendo a las consecuencias afectivo positivas de la cópula (Agmo & Pfaff 1999). Se ha sugerido, que la liberación de opioides podría estar mediada por dopamina ya

que ambos compuestos participan en el sistema endógeno de reforzamiento (Jenkins & Becker 2001; Miller & Baum 1987). Sin embargo, en estudios recientes hemos demostrado que la dopamina no participa en el reforzamiento de la conducta sexual de la hembra. Encontramos, que antagonistas dopaminérgicos administrados intraperitonealmente como el flupentixol y el raclopride en ratas hembras ovariectomizadas y tratadas hormonalmente, no bloquean el efecto afectivo positivo inducido por la cópula regulada (Garcia Horsman & Paredes 2004). Así mismo, antagonistas dopaminérgicos tampoco bloquean el CPL inducido por la cópula en machos. Por otro lado, el estado fisiológico inducido por la cópula en los machos (Agmo & Berenfeld 1990; Agmo & Gomez 1993), y por la cópula regulada en hembras (Paredes & Martinez 2001) se bloquea por la inyección sistémica de naloxona. De cualquier manera poco se conoce acerca de los circuitos neuronales que participan en el control de la cópula regulada en la rata hembra. Algunas de las estructuras que se han identificado como esenciales para diferentes aspectos de la conducta sexual de la rata hembra son el hipotálamo ventromedial (HVM), el área preóptica medial (APM) y la amígdala (AMG) (ver la siguiente sección). El objetivo de la presente investigación es evaluar si estas estructuras participan también en el aspecto afectivo positivo de la cópula regulada.

Capítulo 4. Control neural de la conducta sexual de la rata hembra

A pesar de la gran cantidad de estudios sobre la regulación de la conducta sexual femenina, poco se conoce sobre los aspectos neurales que traducen la estimulación durante la cópula en diferentes estados fisiológicos como los placenteros. Sin embargo el estudio de los mecanismos neurales involucrados en la expresión de la conducta sexual femenina, ha contribuido enormemente al conocimiento de la relación estructura función y su correspondiente acción hormonal. En los últimos años ha crecido el interés por entender los mecanismos de acción hormonal sobre el despliegue de la conducta sexual femenina. Así mismo, no solo el estudio del control de la conducta de lordosis sino también el estudio de los sitios neurales que regulan la expresión de la amplia gama de conductas que presenta una hembra receptiva. Las áreas cerebrales que se han estudiado son aquellas involucradas en reconocer a los estrógenos y a la progesterona, capaces de procesar la información que la hembra recibe de la estimulación de los flancos y el área ano genital, que participan en el procesamiento de diferentes intensidades de estimulación que son particulares de la cópula. La conducta de lordosis se encuentra bajo el control de diferentes áreas del sistema nervioso que incluyen el cerebro medio, el tallo cerebral y la médula espinal (Blaustein & Erskine 2002; Pfaff et al 1994). (A través de la utilización de técnicas inmunocitoquímicas que detectan la expresión de genes tempranos (*c-fos*, *Egr-1*), se ha demostrado que diferentes áreas cerebrales se activan como resultado de la estimulación que recibe la hembra durante la cópula (Figura 5).

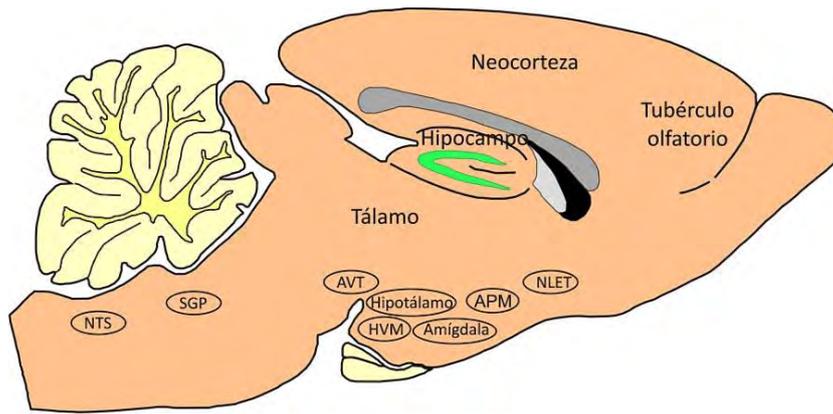


Figura 5. En círculos se marcan algunas de las estructuras que están asociadas al procesamiento de la conducta sexual en la rata hembra.

Así hembras intactas en la tarde del proestro que copularon con el macho y recibieron montas con intromisión incluyendo una eyaculación, expresaron mayor número de células inmunoreactivas a FOS que aquellas que sólo recibieron montas (Erskine 1993; Rowe & Erskine 1993). De igual manera, estudios utilizando estimulación eléctrica o en donde se realizaron lesiones citotóxicas, o de micro diálisis, así como la administración intracerebral de fármacos, han identificado algunas de las estructuras cerebrales involucradas en la regulación de la cópula en la hembra de roedores. Estas son el área preóptica medial (APM), la porción ventrolateral del hipotálamo ventro-medial (HVM), la división posterodorsal de la amígdala medial (mAMIG), la parte posteromedial del núcleo del lecho de la estría terminal (Erskine & Hanrahan 1997; Rowe & Erskine 1993), la corteza del núcleo accumbens (NACB) (Guarraci et al 2002; Jenkins & Becker 2001; Xiao & Becker 1997) y la sustancia gris central del cerebro medio (Blaustein & Erskine 2002) así como el área tegmental ventral (Frye et al 2006). Los experimentos del grupo de

Chiba y colaboradores han reportado que (Hosokawa & Chiba 2007) el APM, el HVM y la AMG son importantes para el procesamiento de las señales olfatorias provenientes del macho con experiencia sexual. Si bien, como ya fue mencionado algunas de estas estructuras han sido asociadas con el control del reflejo de lordosis, pero se desconoce su participación en el control de la cópula regulada en la rata hembra. A continuación, se describen brevemente algunas de las evidencias que demuestran la participación de estas estructuras en el control de la conducta sexual femenina.

4.1 Estructuras cerebrales y conducta sexual en la hembra.

4.1.1 Hipotálamo ventro medial

El hipotálamo ventro medial (HVM) especialmente el área ventrolateral, expresa receptores a estrógenos, progesterona, oxitocina, encefalinas, sustancia P y prolactina, entre otros, que son importantes para el despliegue de la conducta sexual femenina (Blaustein & Erskine 2002). El HVM y los grupos celulares vecinos parecen estar involucrados en la acción hormonal de la receptividad sexual, particularmente del reflejo de lordosis. La estimulación eléctrica, a través de electrodos colocados en la parte lateral del hipotálamo ventromedial de ratas hembra tratadas con estrógenos, facilita el reflejo de lordosis (Pfaff & Sakuma 1979). La estimulación vagino-cervical en hembras ovariectomizadas y tratadas hormonalmente induce un incremento de células inmunoreactivas a FOS en esta área (Erskine & Hanrahan 1997), comparadas con hembras intactas. Lesiones electrolíticas bilaterales o unilaterales del HVM disminuyen los niveles de la lordosis (Richmond & Clemens 1988), particularmente en pruebas en donde la hembra no puede escapar del macho. Sin embargo, en un estudio realizado por Emery y Moss en hembras que regulan la cópula, reportaron que la lesión del HVM disminuye los contactos sexuales, y el tiempo que pasa con un macho sexualmente activo, pero sin afectar la conducta de lordosis (Emery & Moss 1984). Se ha propuesto, que la lesión en esta área provoca una pérdida gradual en la expresión del reflejo de lordosis y que es proporcional con el tamaño de la lesión. Sin embargo, se ha sugerido que esta área no es parte del arco reflejo ya que el déficit en la lordosis se manifiesta de horas a días después de su lesión (Blaustein &

Erskine 2002). Este tipo de lesiones daña específicamente la vía lateral que conecta al HVM con el cerebro medio a través de la región peripeduncular activando la sustancia gris central, reduciendo así la expresión de la lordosis. Se ha propuesto que las lesiones en este núcleo hacen que la hembra interprete como aversivos los estímulos sensoriales emitidos por el macho lo que sugiere que bajo condiciones normales las neuronas hipotalámicas sean las responsables de codificar la información somato sensorial. Lo que sugiere, que el HVM juega un papel muy importante en la modulación de la información sensorial hormono-dependiente que se recibe para que se exprese la conducta sexual femenina (Pfaff et al 1994). Sin embargo, no se conoce la participación de esta área en el efecto afectivo positivo de la cópula regulada.

4.1.2 Área preóptica medial

El área preóptica medial del hipotálamo anterior (APM) ha sido preferentemente asociada con la regulación de la expresión de la conducta sexual masculina, en una gran variedad de vertebrados. Las lesiones de esta área eliminan la cópula en ratas macho (Paredes 2003). Sin embargo, el APM también juega un papel importante en la regulación del comportamiento sexual femenino, proponiéndose principalmente como un área cerebral inhibitoria de la expresión de la postura de lordosis (Hoshina et al 1994; Sakuma 1994; 1995). Así, en contraste con el HVM, las lesiones bilaterales del APM incrementan el reflejo de lordosis, mientras que la estimulación de la misma disminuye la expresión de esta respuesta. Interesantemente, las lesiones electrolíticas o químicas de esta área, también interfieren con algunos parámetros de la cópula

regulada. Por ejemplo, incrementan el porcentaje de salidas después de una intromisión así como también, la latencia de regreso después de una intromisión o una eyaculación (Yang & Clements 2000). También se ha comprobado, que las neuronas del APM se activan durante la cópula ya que registros de la actividad eléctrica de esta área, demuestran que diferentes tipos de neuronas cambian su actividad neural como respuesta a diferentes componentes de la cópula (Kato & Sakuma 2000). Sin embargo, los efectos de las lesiones del APM sobre la conducta sexual femenina dependen del contexto en el que se realiza la prueba. Por ejemplo, mientras que las lesiones aumentan las respuestas de lordosis en las hembras que no regulan la cópula, en hembras que si regulan la conducta sexual, las lesiones del APM reducen el tiempo que pasan con el macho, sugiriendo la disminución en la motivación sexual (Yang & Clements 2000), lo que sugiere que esta área juega un papel importante en el procesamiento de los aspectos motivacionales involucrados en la expresión normal de la conducta de estro. Al igual que en otras áreas, los efectos de la lesión de este núcleo sobre la conducta sexual están directamente relacionados con el tamaño de la lesión. Sin embargo, al igual que con el HVM el papel que el APM juega en el estado afectivo positivo de la cópula regulada no ha sido bien estudiado.

4.1.3 Amígdala

La amígdala (AMG) es una estructura que también se ha asociado con la integración de la información proveniente de la estimulación que la hembra recibe durante la cópula. Se ha demostrado que las hembras que regulan la cópula, presentan mayor número de células inmunoreactivas para FOS en la amígdala medial postero-dorsal (AMGPD), comparadas con aquellas que no regulan la cópula o que recibieron solamente montas (Erskine & Hanrahan 1997). Con base en estos y otros resultados, el grupo de la Dra. Erskine propuso que la AMGPD es una de las áreas que procesa e integra los estímulos sensoriales que provienen de la estimulación vagino-cervical que la hembra recibe durante el apareamiento, y no sólo procesa la cantidad de estimulación recibida, sino que también la calidad de la misma (Erskine & Hanrahan 1997; Erskine et al 2004). Estos datos sugieren que la actividad que la estimulación vaginocervical genera en la AMGPD puede generar actividad en otras áreas del hipotálamo importantes para el procesamiento tanto de la conducta sexual como de los cambios neuroendocrinos que esta misma conducta provoca (Figura 6).

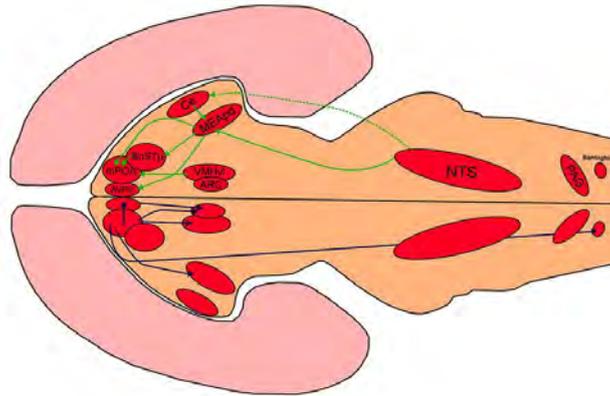


Figura 6. Representación esquemática de las posibles conexiones anatómicas de las vías que se activan como resultado de la estimulación vaginocervical. (Esquema modificado de Erskine et al 2004).

4.1.4 Estriado y núcleo accumbens

Regiones como el estriado y el núcleo accumbens, han sido asociadas a la conducta de cópula regulada en la rata hembra (Becker et al 2001; Jenkins & Becker 2001; Xiao & Becker 1997). El grupo de Becker propone que estas estructuras juegan un papel importante en el procesamiento de claves sensoriales asociadas al tipo y grado de estimulación que la hembra recibe del macho durante el apareamiento. Ellos encontraron un incremento de dopamina en estas estructuras como resultado de las intromisiones y eyaculaciones recibidas por la hembra cada vez que ésta busca al macho. Estos autores sugieren que tanto el núcleo accumbens como el estriado son estructuras asociadas al efecto reforzante inducido por el apareamiento. Sin embargo, sus resultados han sido muy discutidos, por un lado Jenkins y Becker (Jenkins & Becker 2001) proponen que las lesiones bilaterales del núcleo accumbens

interfieren con la conducta de cópula regulada. Es decir las hembras lesionadas evitan los contactos sexuales con el macho pero cuando las hembras no controlan la cópula, las lesiones parecen no tener ningún efecto: éstas muestran un comportamiento normal, cociente de lordosis normal y contactos normales. Por otro lado, las lesiones del estriado disminuyen el porcentaje de salidas después de la eyaculación esto es pasan más tiempo en el compartimento del macho contadictoriamente la lesion no afecta el porcentaje de regresos y tampoco muestran ningun deficit en la lordosis ni en su estado general de receptividad (Jenkins & Becker 2001). Es evidente que los resultados de las lesiones del accumbens y el estriado sobre la conducta sexual, no son consistentes, ya que es difícil aceptar cómo lesiones en una estructura pueden modificar un parámetro conductual como las latencias de regreso dejando intactas las latencias de salida (Guarraci et al 2002). Los autores explican esta discrepancia diciendo que las hembras pueden ser capaces de disociar entre una conducta motivante y la capacidad o habilidad de realizar una respuesta. Futuros experimentos serán necesarios para entender la participación de estas estructuras en el control de la conducta sexual.

En resumen, de acuerdo a la evidencia anterior existen diferentes áreas en el sistema nervioso central que tienen un papel preponderante en la regulación de la conducta sexual femenina. La estimulación sensorial y vagino-cervical durante el apareamiento estimula diversas estructuras del sistema nervioso, y muchas de las células en estas áreas contienen receptores a estrógenos que parecen ser el sustrato del procesamiento de las señales hormonales obtenidas como resultado de la estimulación del macho.

Capítulo 5. Trabajo de Investigación

5.1 Planteamiento de problema

Los componentes motivacionales de la cópula en la hembra han sido poco estudiados. Estudios previos muestran que los opioides participan en la conducta sexual de los machos (Agmo & Berenfeld 1990; Agmo & Gomez 1991; 1993; Agmo et al 1994; Agmo & Paredes 1988) y en el estado afectivo positivo inducido por la CR en hembras (Paredes & Martinez 2001). A pesar del gran esfuerzo en identificar las estructuras que se activan durante la estimulación sexual en la hembra, poco se conoce en relación de los eventos neurales que traducen la estimulación sexual en el estado afectivo placentero inducido por la cópula regulada. Dada la complejidad de la interacción entre los diversos estímulos sensorio motores y procesos motivacionales que participan en el apareamiento es claro que diversas estructuras cerebrales se encuentran involucradas. El propósito del presente trabajo es conocer la participación de diferentes estructuras cerebrales en los estados afectivos positivos de la copula en la hembra. Para el logro de este objetivo se administrará el antagonista opioide naloxona, en el APM, HVM, ACB o AMG evaluando su efecto en el estado afectivo positivo inducido por la cópula regulada utilizando el CPL. Esto nos permitirá identificar el circuito neuronal que se activa durante la copula en las hembras y que contribuye al estado afectivo positivo de la copula. También nos permitirá identificar si estas estructuras son diferentes a las que se activan en los machos o si existe un circuito general de reforzamiento sexual en ambos sexos.

5.2 Hipótesis

Hipótesis (1)

La naloxona administrada directamente en el área preóptica medial o en el núcleo ventromedial del hipotálamo, en ratas hembra modificará los parámetros de la cópula regulada.

Hipótesis (2)

Naloxona administrada en la amígdala o el núcleo accumbens no tendrá ningún efecto en los parámetros conductuales evaluados durante la cópula regulada.

Hipótesis (3)

La administración de naloxona en el área preóptica medial o en el núcleo ventro-medial del hipotálamo bloqueará el condicionamiento de preferencia de lugar inducido por la cópula regulada.

Hipótesis (4)

La administración de naloxona en la amígdala o en el núcleo accumbens antes de la cópula no interferirá en el condicionamiento de preferencia de lugar inducido por la cópula regulada.

Hipótesis (5)

La administración de naloxona en el área preóptica medial, en el núcleo ventromedial del hipotálamo o en la amígdala no modificara la motivación hacia un incentivo sexual.

5.3 Objetivo General

Determinar si un antagonista opioide como la naloxona administrado intracerebralmente en diferentes estructuras cerebrales, puede bloquear el CPL inducido por la cópula regulada, y/o modificar los parámetros conductuales observados en una hembra sexualmente receptiva durante la cópula con un macho sexualmente experto.

5.4 Objetivos específicos

(1) Evaluar el efecto de naloxona metil-iodada administrada en diferentes estructuras cerebrales incluyendo: el área preóptica medial (APM), el hipotálamo ventro-medial (HVM), la amígdala medial postero dorsal (AMG) y el núcleo accumbens (ACB) sobre los diferentes parámetros de la cópula regulada.

(2) Evaluar el efecto de la infusión de naloxona metil-iodada en cada una de las estructuras antes mencionadas sobre el condicionamiento de preferencia de lugar inducido por la cópula regulada.

(3) Realizar pruebas de motivación sexual hacia un incentivo, después de la infusión de naloxona en el aquellas áreas cerebrales en las cuales este fármaco haya tenido un efecto.

Para poder entender que los receptores a hormonas esteroides pueden ser activados por otros neurotransmisores para dar lugar a la conducta sexual, es necesario considerar el rol potencial de otras rutas de activación como es el caso de la dopamina. Existen grandes controversias sobre el significado funcional de la dopamina durante la cópula, y esto se debe en gran medida, a que este neurotransmisor activa vías de señalización de segundos mensajeros que activan indirectamente a los receptores a esteroides. Estudios farmacológicos han mostrado que agonistas dopaminérgicos específicos D_1 administrados intracerebralmente facilitan la conducta sexual particularmente en la expresión de las conductas motoras como el reflejo de lordosis. Este efecto puede ser bloqueado tanto por antagonistas a progesterona como antagonistas D_1 lo que sugiere la acción de la dopamina a través de los receptores de progesterona como mediadores transcripcionales de la vía iniciada por dopamina en la conducta sexual (Blaustein 2007; Mani 2001; Mani et al 2000; Mani et al 2006). De cualquier forma no se ha demostrado la participación de la dopamina en el efecto afectivo positivo de la cópula regulada.

Por otro lado, se conoce que los péptidos opioides juegan un papel crucial en los mecanismos de reforzamiento (Agmo et al 1993; Agmo & Gomez 1993; Agmo et al 1994; Agmo & Paredes 1988). Estudios realizados en la rata macho, se ha propuesto que durante la eyaculación, se liberan opioides endógenos que participan en las propiedades placenteras de dicho evento (Agmo & Berenfeld 1990). Además, tanto la administración sistémica como intracerebral de antagonistas opioidérgicos, bloquean la preferencia de lugar inducida por la eyaculación (Agmo & Berenfeld 1990). Por otro lado, se conoce

que la administración sistémica de naloxona, antagonistas de opioides, bloquea el CPL inducido por la cópula regulada de las hembras (Paredes & Martínez 2001). Sin embargo, no se conocen las estructuras o los circuitos neuronales, ni los mecanismos por los cuales el cerebro asimila e interpreta los efectos afectivos positivos inducidos por la cópula. Los trabajos enfocados al estudio de los circuitos neurales involucrados en el procesamiento de los estímulos durante la cópula regulada, han demostrado que utilizando la expresión de genes tempranos se observa incremento en el número de células inmunoreactivas a FOS. Así en diversas estructuras como en el área preóptica medial, el núcleo ventro-medial del hipotálamo, el núcleo lecho de la estría terminal, y la amígdala medial se observa este inmunomarcaje (Erskine 1993; Erskine & Hanrahan 1997). Es importante señalar que, a pesar de que durante las últimas décadas se ha estudiado la relación neuroanatómica y los mecanismos relacionados a las consecuencias neuroendocrinas y conductuales de la estimulación vagino cervical, se desconoce si las mismas estructuras participan también en el circuito involucrado en los aspectos placenteros inducidos por la cópula regulada.

Con base a lo anterior, el presente trabajo pretende identificar algunas de las estructuras cerebrales que participan en la motivación sexual incentiva y en los estados placenteros asociados a la cópula regulada.

Capítulo 1. Motivación sexual

El proceso por el cual una hembra busca tener contacto sexual con un macho se conoce como motivación sexual. El primer análisis sistemático de la motivación sexual fue realizado por Beach en 1956 (Beach 1956). Este autor postuló que existe un mecanismo de excitación sexual que activa la conducta de cópula. Posteriormente, Hardy en 1973 describió a la motivación sexual como motivación apetitiva, también conocida como motivación a un incentivo sexual (Agmo 1999; Hardy & DeBold 1973). Así, en la rata hembra en estro, la presencia del macho le provoca una conducta de aproximación y retirada la cual lo estimula para que se realice el patrón conductual completo de la cópula.

Estudios realizados en ambientes semi-naturales muestran que las hembras realizan una variedad de patrones de solicitud para atraer al macho e incitar la cópula (Anisko et al 1978; McClintock & Adler 1978; McClintock & Anisko 1982). Posteriormente se realizaron observaciones bajo estándares controlados de laboratorio, y se evaluó el despliegue conductual y la complejidad de los patrones de solicitud que muestra una hembra en estro. Se observó que la hembra influye de manera determinante en el patrón de apareamiento ya que produce contactos periódicos e intermitentes de solicitud hacia el macho sexualmente activo.

Estas conductas, además de generar cambios neuroendocrinos, inducen a su vez cambios neuroquímicos que aseguran el éxito reproductivo.

Los aspectos motivacionales de la conducta sexual se han estudiado utilizando una gran variedad de métodos, entre los cuales se encuentra el paradigma de CPL. Este método de aprendizaje asociativo consiste en

relacionar claves medioambientales, tales como las visuales y olfatorias con el efecto inducido por un tratamiento que produce un estado fisiológico específico. Este estado puede tener consecuencias tanto positivas como negativas que dependen del tratamiento y que puede provocar un incremento o decremento en el tiempo que el sujeto pasa en el compartimiento que originalmente no prefería. Utilizando este paradigma, se ha demostrado que la conducta sexual en la rata hembra induce un estado afectivo-positivo, cuando ésta tiene la posibilidad de controlar los contactos físicos o interacciones sexuales con el macho. Es decir, esta conducta produce un estado fisiológico de suficiente intensidad y duración que puede ser asociado a las características físicas de la caja de CPL e inducir un cambio de preferencia. A esta conducta en donde la hembra tiene el control sobre los contactos físicos con el macho, se le conoce como "cópula regulada" (Beach 1976; Blaustein & Erskine 2002; Erskine 1989). Esta conducta, está asociada a la habilidad de la hembra para discriminar diferentes grados de intensidad de estimulación sexual. Se ha observado que las hembras en estro, realizan este patrón de acercamientos y retirada hacia el macho con el propósito de reducir los estados aversivos que produce la intensa estimulación vaginal por la intromisión peneana. Cuando la hembra se somete a numerosas montas, intromisiones y eyaculaciones, los intervalos de contacto con el macho se incrementan considerablemente, se disminuye la probabilidad que la hembra despliegue el reflejo de lordosis así como la intensidad del mismo. Aparentemente, la intensidad de la estimulación que la hembra recibe durante la cópula determina la frecuencia de acercamiento hacia el macho y a medida que la estimulación es mayor se incrementa el tiempo para que la hembra

reanude la cópula. Esto es, las latencias de regreso después de que la hembra recibió una eyaculación son mayores que después de una intromisión, y éstas mayores que las latencias de regreso después de una monta (Erskine 1989; Pfaff et al 2002).

1.1 Neurotransmisores y Neuropéptidos

Otro aspecto importante en el estudio de los componentes fisiológicos involucrados durante la cópula de hembras de varias especies de mamíferos, es el estudio de los neurotransmisores y neuropéptidos que participan durante la conducta sexual. Diferentes péptidos son liberados al espacio sináptico durante la cópula, entre ellos se encuentran, la oxitocina, la dopamina, la serotonina, las catecolaminas y los péptidos opioides;(Agmo & Berenfeld 1990; Guarraci & Clark 2003; Knobil & Neill 1994b; Kudwa et al 2005; McCarthy et al 1994; Mehrara & Baum 1990; Mermelstein & Becker 1995; Paredes et al 2000; Paredes & Martinez 2001; Pfaus et al 1995; Pfaus et al 2001; Yang & Voogt 2001). Es necesario aclarar aquí, que la conducta sexual femenina no solo es el resultado de la acción de las hormonas gonadales, sino que hay una gran variedad de otros compuestos y moléculas y una multitud de vías de señalización que activan segundos y terceros mensajeros dentro de la neuronas, que le agregan otros niveles de complejidad a los mecanismos involucrados en la conducta sexual femenina. Estos compuestos incluyen nucleótidos como adenosinas y guanosinas, prostaglandinas, oxido nítrico entre otros. Por ejemplo la vía de señalización de las proteínas cinasa de acción mitogénica (MPAK) que parece amplificar e integrar señales de otros

estímulos extracelulares para activar o inhibir la conducta sexual femenina, cómo estos múltiples mecanismos coexisten y aseguran la respuesta de la neurona a la señal correcta para controlar una respuesta genómica y conductual tan específica, permanece aún sin respuesta (Blaustein 2007; Mani 2008). De igual manera, no ha sido posible esclarecer tampoco el papel que juega el sistema de neurotransmisores involucrados en el estado afectivo positivo o placentero inducido por la cópula. A pesar de que se ha propuesto que la dopamina podría ser un buen candidato involucrado en los procesos reforzantes o placenteros de la cópula (Hull et al 1999; Kudwa et al 2005; Mermelstein & Becker 1995; Pfaus et al 2001) pero no participa de manera importante en los aspectos motivacionales de la misma (Agmo & Fernandez 1989; Garcia Horsman & Paredes 2004; Paredes & Agmo 2004).

Para poder entender que los receptores a hormonas esteroides pueden ser activados por otros neurotransmisores para dar lugar a la conducta sexual, es necesario considerar el rol potencial de otras rutas de activación como es el caso de la dopamina. Existen grandes controversias sobre el significado funcional de la dopamina durante la cópula, y esto se debe en gran medida, a que este neurotransmisor activa vías de señalización de segundos mensajeros que activan indirectamente a los receptores a esteroides. Estudios farmacológicos han mostrado que agonistas dopaminérgicos específicos D_1 administrados intracerebralmente facilitan la conducta sexual particularmente en la expresión de las conductas motoras como el reflejo de lordosis. Este efecto puede ser bloqueado tanto por antagonistas a progesterona como antagonistas D_1 lo que sugiere la acción de la dopamina a través de los receptores de progesterona como mediadores transcripcional de la vía iniciada

por dopamina en la conducta sexual (Blaustein 2007; Mani 2001; Mani et al 2000; Mani et al 2006). De cualquier forma no se ha demostrado la participación de la dopamina en el efecto afectivo positivo de la cópula regulada.

Por otro lado, se conoce que los péptidos opioides juegan un papel crucial en los mecanismos de reforzamiento (Agmo et al 1993; Agmo & Gomez 1993; Agmo et al 1994; Agmo & Paredes 1988). Estudios realizados en la rata macho, se ha propuesto que durante la eyaculación, se liberan opioides endógenos que participan en las propiedades placenteras de dicho evento (Agmo & Berenfeld 1990). Además, tanto la administración sistémica como intracerebral de antagonistas opioidérgicos, bloquean la preferencia de lugar inducida por la eyaculación (Agmo & Berenfeld 1990). Por otro lado, se conoce que la administración sistémica de naloxona, antagonistas de opioides, bloquea el CPL inducido por la cópula regulada de las hembras (Paredes & Martinez 2001). Sin embargo, no se conocen las estructuras o los circuitos neuronales, ni los mecanismos por los cuales el cerebro asimila e interpreta los efectos afectivos positivos inducidos por la cópula. Los trabajos enfocados al estudio de los circuitos neurales involucrados en el procesamiento de los estímulos durante la cópula regulada, han demostrado que utilizando la expresión de genes tempranos se observa incremento en el número de células inmunoreactivas a FOS. Así en diversas estructuras como en el área preóptica medial, el núcleo ventro-medial del hipotálamo, el núcleo lecho de la estría terminal, y la amígdala medial se observa este inmunomarcaje (Erskine 1993; Erskine & Hanrahan 1997). Es importante señalar que, a pesar de que durante las últimas décadas se ha estudiado la relación neuroanatómica y los

mecanismos relacionados a las consecuencias neuroendocrinas y conductuales de la estimulación vagino cervical, se desconoce si las mismas estructuras participan también en el circuito involucrado en los aspectos placenteros inducidos por la cópula regulada.

Con base a lo anterior, el presente trabajo pretende identificar algunas de las estructuras cerebrales que participan en la motivación sexual incentiva y en los estados placenteros asociados a la cópula regulada.

Capítulo 2. Fisiología de la conducta sexual femenina.

2.1 Ciclo estral de la rata hembra

En la mayoría de las especies la información genética es quien determina que un individuo sea hembra o macho al actuar tanto a nivel gonadal como a nivel del sistema nervioso central. A medida que el individuo se desarrolla, las hormonas secretadas por las gónadas (ya sea antes o después del nacimiento, dependiendo de la especie de mamíferos) producen “efectos organizacionales” que inducen una diferenciación, crecimiento y supervivencia celular, dando como resultado la masculinización o feminización y su manifestación conductual ya en el animal adulto (Knobil & Neill 1994a).

Como en la mayoría de las especies de mamíferos, en la rata hembra se presentan períodos de actividad sexual cíclicos, es decir, períodos de receptividad que se presentan alternadamente con períodos de no-actividad sexual, *estro* y *anestro* respectivamente (Morali & Beyer 1979). Estos períodos se conocen como ciclo estral y obedecen a cambios en la función ovárica inducidos por el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. Durante el ciclo estral, se secretan diferentes hormonas hipofisarias como la luteinizante y la folículo estimulante que preparan al sistema reproductor para su fertilización (Figura 1). La liberación de estradiol seguido de progesterona, desde los ovarios, inducen la expresión de la conducta de *estro* si la hembra se encuentra frente a un

macho mostrará diferentes patrones conductuales que darán lugar al apareamiento (Blaustein & Erskine 2002; Pfaff et al 2002).

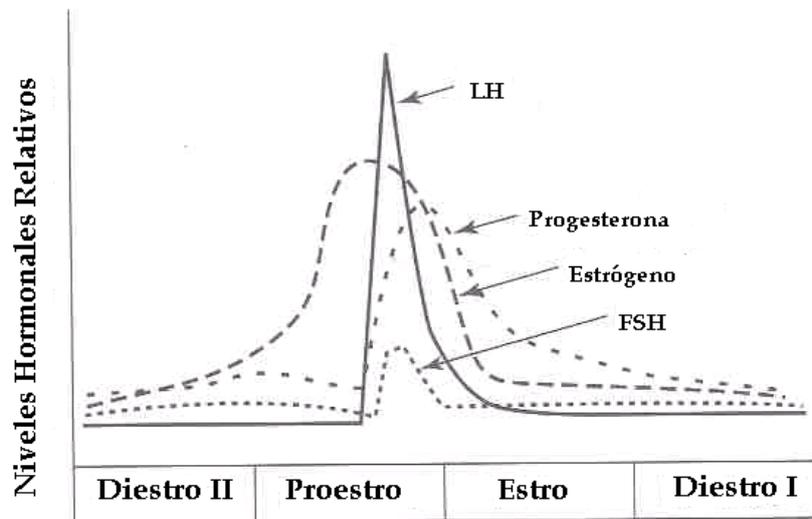


Figura 1. La acción secuencial de estradiol y progesterona provoca el comportamiento de lordosis que se presenta de manera más intensa durante el proestro tardío y principios del estro. (Modificado de (Schumacher et al 1999)).

El ciclo estral en la rata es muy corto cuatro o cinco días aproximadamente. Durante este ciclo se presentan cuatro fases: *metaestro o diestro I*, *diestro II*, *proestro* y *estro*. Las fluctuaciones en el comportamiento sexual de la rata hembra dependen de las variaciones de su función ovárica. Se conoce que el *estro* es la fase de mayor actividad sexual, mientras que el *diestro I* es la etapa en donde la hembra muestra mayor rechazo sexual, las otras dos fases son de transición (Morali & Beyer 1979). Los cambios físicos son evidentes, durante el período pre-ovulatorio hay crecimiento de los folículos ováricos que corresponde al aumento en la secreción de estrógenos. Sin embargo, durante el *diestro (I)* no hay importantes variaciones en los niveles de estradiol, sino hasta el *diestro II* en donde gradualmente se comienza a incrementar. A

medida que el *proestro* transcurre, el la secreción de estradiol se incrementa hasta alcanzar su máximo nivel de concentración hacia la mitad del *proestro* y disminuye significativamente al inicio del *estro*. Cuando el estradiol ha alcanzado su pico máximo se presenta incremento de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), liberada desde el hipotálamo hacia la eminencia media. Esta hormona llega a través del sistema portal hipofisiario por vía sanguínea hasta la pituitaria, incrementando la secreción de la hormona luteinizante (LH) que llega a su nivel de concentración más alto al final del *proestro* (Knobil & Neill 1994b). La secreción de progesterona proviene por un lado de las células de la teca interna y posteriormente de las células de la granulosas o cuerpo amarillo que se forma después de la ovulación, por lo tanto, la primera secreción se produce en la tarde-noche del *proestro* y la otra al final del *metaestro* en el cual esta hormona se mantiene en niveles altos si es que hay fertilización. El incremento secuencial del estradiol y la progesterona provocan que se despliegue la conducta sexual femenina (con una duración entre 13 y 15 horas), coincidiendo con el período de ovulación. En la Figura 2 se muestran los niveles circulantes de progesterona, prolactina, estradiol, LH, y FSH en plasma obtenidos cada dos horas durante cada día en las diferentes fases del ciclo reproductor de la rata hembra (Knobil & Neill 1994b).

Cuando la concentración de estrógenos en el plasma sanguíneo comienza a decrecer, el ciclo ha llegado a la última fase, el *estro* (Morali & Beyer 1979). El aumento en la secreción de progesterona coincide con el inicio de la receptividad conductual en la rata y tiene una duración de 13 a 15 horas (Figuras 1 y 2).

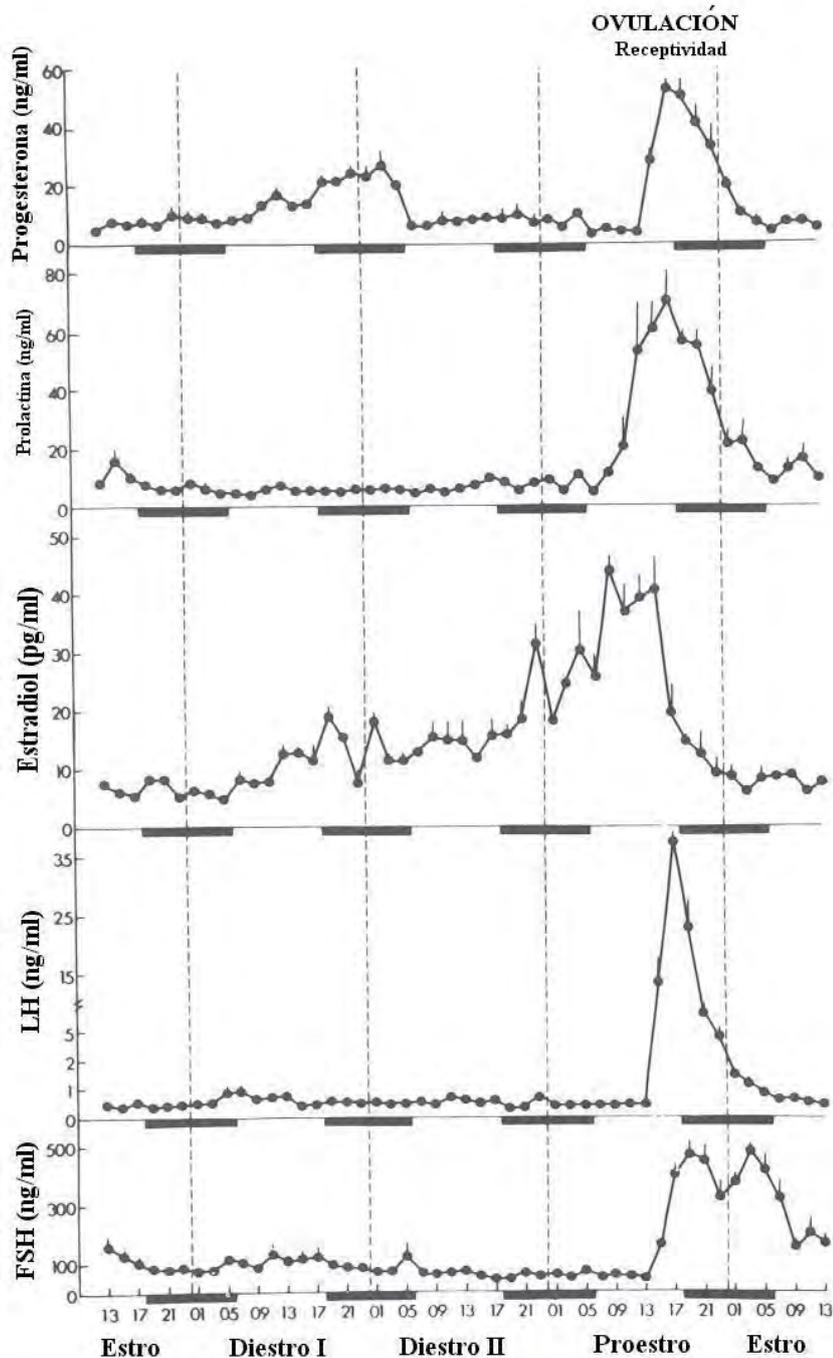


Figura 2. Patrón de concentración hormonal en el plasma a intervalos de 2-horas durante el ciclo estral de la rata. En la gráfica se indica el período en el cual ocurre la receptividad sexual y la ovulación. Las barras negras representan el intervalo de oscuridad en un ciclo de 12-12 h. (Modificada de Freeman en Knobil y Neill, 1994).

Cuando una hembra es ovariectomizada (OVX), los ciclos hormonales desaparecen y el animal permanece en diestro I continuo. Sin embargo, la

administración secuencial de estradiol y progesterona reactivarán la aparición de la conducta de estro (Knobil 1994). El ciclo hormonal se encuentra estrechamente relacionado con los cambios en el epitelio del tracto reproductivo. Por ejemplo, la citología de estas fases puede ser identificada por medio de la descamación celular que sufre la vagina y que se puede visualizar a través de la obtención de frotis vaginales. Los efectos de los estrógenos sobre la mucosa vaginal son mucho más pronunciados que los de la progesterona ya que la concentración de estrógenos circulante es mayor durante el proestro; mientras que en el estro existe una mayor proliferación y exfoliación de las células (Figura 3 A). Por otro lado, durante el proestro o anestro se presentan mayor número de leucocitos y células anucleadas Figura 3 (B).

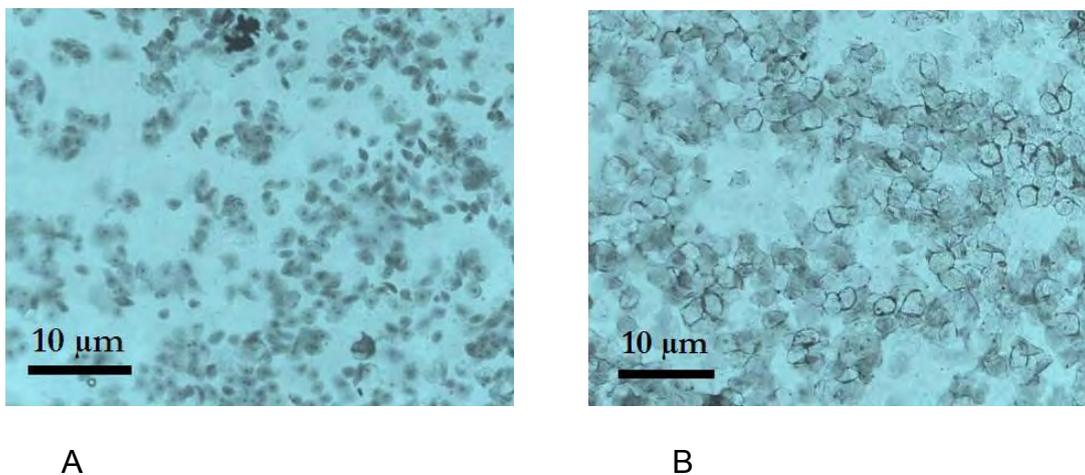


Figura 3. Fotomicrografías del frotis vaginal, de una rata OVX En (A) en diestro o anestro como puede observarse la flecha muestra las células queratinizadas de núcleo bien definido y en (B) en estro, células cornificadas con núcleos picnóticos como se indica con la flecha.

Capítulo 3. Comportamiento sexual de la hembra.

La conducta sexual de la hembra se caracteriza por tres componentes principales: 1) atractividad, 2) proceptividad o conducta de solicitud y 3) receptividad, caracterizada por el reflejo de lordosis. A través de estas conductas la hembra mantiene proximidad con el macho e incrementa la probabilidad de una interacción sexual (Beach 1976; Deswurry 1968; Morali & Beyer 1979).

La atractividad se define como la habilidad que tiene una hembra para atraer a un macho con el fin de llevar a cabo la cópula (Beach 1976), e incluye diferentes aspectos adaptativos. Dichos aspectos van desde el acercamiento al macho, hasta el apareamiento a través de señales sensoriales. Así, el macho identifica tanto el sexo, como el estado reproductivo en que se encuentra la hembra, con la finalidad de que éste oriente y sincronice sus respuestas coitales de intromisión y emisión de esperma (Beach 1976).

La proceptividad o conducta de solicitud, se refiere a todas aquellas conductas estereotipadas que realiza la hembra y que son dirigidas al macho para invitarlo a copular con ella. Estas conductas incluyen: a) orejeo, movimiento de alta frecuencia de la cabeza que provoca que las orejas también se muevan; b) brincoteo, la hembra realiza pequeños brincos con sus cuatro patas; c) carreras cortas en forma de zig-zag que terminan abruptamente con una postura agazapada de la hembra d) movimientos de acercamiento y retirada hacia el macho y e) emisión de sonidos ultrasónicos (Beach 1976; Erskine 1989). La receptividad se refiere a la postura del reflejo de lordosis que se produce en respuesta a la monta que el macho le realiza a la hembra. La

lordosis se define como la dorsiflexión de la columna dorsolumbar con elevación de la cabeza y el tren posterior, seguida de un movimiento lateral de la cola para que facilite la intromisión peneana (Beach 1976; McClintock & Adler 1978). La probabilidad de que la lordosis se presente, está relacionada directamente con los niveles hormonales de estradiol y progesterona provenientes de las gónadas. Esto sucede durante el pro-estro tardío e inicios del estro.

La evaluación de la conducta sexual femenina en la rata se ha llevado a cabo por medio de la utilización del cociente de lordosis (CL), el cual se obtienen al contar el número de veces que la hembra despliega la conducta de lordosis dividido por el número de montas y multiplicado por cien. Por lo tanto, un coeficiente alto corresponde a un alto grado de receptividad, y viceversa (Beach 1976). Otra forma de evaluar la receptividad es cuantificando la intensidad de la lordosis. Esta cuantificación fue inicialmente propuesta por Hardy y DeBold (Hardy & DeBold 1972) a través de sumar el grado de arqueamiento de la columna vertebral durante la expresión de la lordosis. El grado de dorsiflexión va desde 0, cuando no la hembra no despliega lordosis, 1 si el arqueamiento es leve y 2 ó 3 si el arqueamiento de la columna es pronunciado (ver Figura 4). Por lo tanto, la sumatoria de todos los valores obtenidos en cada lordosis individual, dividido por el número de montas y multiplicado por 10, será lo que corresponde a la intensidad media de lordosis.

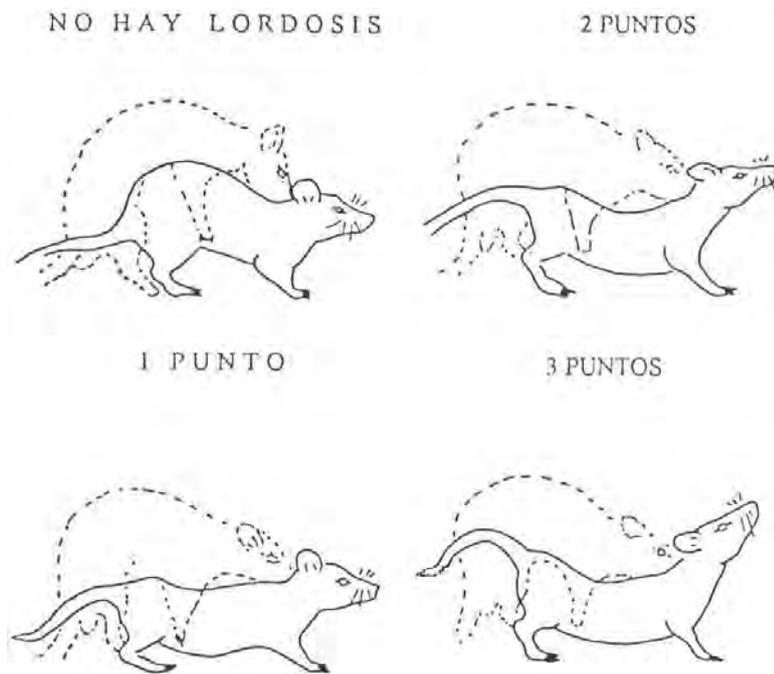


Figura 4. Cuantificación del grado de lordosis (Hardy & DeBold 1972).

En conclusión, el repertorio conductual que la hembra desplegará durante el estro, dependerá principalmente de la interacción sinérgica de las hormonas gonadales (estrógeno y progesterona), de las características del medioambiente en donde se realice (Beach 1976; Brandling-Bennett et al 1999; Delville 1991; Fadem et al 1979; Komisaruk 1974; Mani et al 1994; Menard & Dohanich 1994; Whalen 1974), y de su experiencia. Además, la compleja gama de conductas que realiza la hembra para atraer al macho juega un papel importante para la determinación del tipo y la cantidad de estimulación que la hembra recibe durante el apareamiento. Consecuentemente, la conducta que la hembra realice será parte importante de las conductas de interacción subsecuentes.

3.1 Cópula Regulada

Expresión de la conducta sexual femenina en la rata adulta

En condiciones semi-naturales se ha observado que la conducta de cortejo es el resultado de la participación de ambos sexos. Estudios clásicos realizados por el grupo de Martha McClintock demostraron que tanto la hembra como el macho tienen, un papel muy activo y ambos regulan la cópula controlando el número de contactos entre ellos durante la interacción sexual (McClintock & Adler 1978; McClintock & Anisko 1982; McClintock et al 1982). En el caso de la hembra, ésta realiza acercamientos y retiradas consecutivamente del macho hasta que llega a ser estimulada con montas, intromisiones y eventuales eyaculaciones. Sin embargo, si la hembra permite recibir una intensa y prolongada estimulación vagino-cervical, las conductas proceptivas y la lordosis disminuyen significativamente al punto en que la hembra comienza a rechazar al macho. Si la hembra tiene la posibilidad de mantenerse alejada del macho, lo siguiente ocurre dependiendo de la estimulación que la hembra recibe durante el apareamiento, los intervalos de tiempo entre los contactos con el macho serán cortos si recibe un a monta, más largos si recibe una intromisión y mucho más prolongados si recibe una eyaculación. A esta capacidad de espaciar la estimulación sexual por parte de la hembra se le conoce como cópula regulada o "pacing". El número óptimo de intromisiones y el intervalo entre las mismas requiere de un patrón específico para inducir un estado de preñez (Erskine 1989; Erskine et al 1989). Experimentos realizados en el laboratorio, se ha demostrado que cuando los animales tienen la posibilidad de regular los contactos con la pareja, por

ejemplo, en el caso de las hembras, prefieren períodos más largos entre las intromisiones que los machos, mientras que los machos prefieren intromisiones cortas y regulares que les lleven rápido a la eyaculación (Erskine et al 1989).

En los últimos años se ha puesto particular interés al estudio de la cópula regulada y las consecuencias neuroendocrinas que ésta desencadena. Se ha demostrado, por ejemplo, que cuando la hembra regula la cópula, el intervalo inter contacto aumenta progresivamente, siendo los intervalos entre monta más cortos que los de las intromisiones y que los de la eyaculación. Las hembras con disección de los nervios pudendo y pélvico son incapaces de regular la cópula (Erskine 1992). También se ha descrito, desde el punto de vista neuroendocrino, que las hembras que son capaces de regular la cópula requieren menos intromisiones para quedar preñadas incrementándose la intensidad de la estimulación vagino-cervical provocando que las intromisiones sean más efectivas. Además, se ha demostrado que la cópula regulada reduce el número de intromisiones que se requieren para transportar al esperma a través del cervix y así desencadenar el reflejo neuroendocrino involucrado en producir la preñez o pseudo-preñez (Erskine et al 1989).

Con base a estudios anteriores (Bermant 1961; Erskine 1989; Erskine et al 1989; Peirce & Nuttall 1961a; b; Pfaus 1999b; Pfaus et al 1999) en nuestro laboratorio hemos implementado cajas especiales en donde las hembras pueden regular el número de contactos que reciben del macho (ver en el método el apartado de Aparatos). Las cajas son de acrílico y poseen dos compartimientos divididos por una placa acrílica con un orificio central en la parte inferior. El propósito de este orificio es permitir que solo la hembra, por su tamaño, sea capaz de pasar de un lugar a otro sin que el macho pueda seguirla

(ver sección de aparatos Figura 7). De esta manera la hembra es quien controla la estimulación sexual proveniente del macho. Además, en nuestros experimentos combinamos cópula regulada con el método de CPL (ver la sección anterior) que nos permite evaluar los efectos fisiológicos que induce la cópula.

3.2 Condicionamiento de preferencia de lugar

Existe tanto el método de aprendizaje clásico como el operante para evaluar los aspectos motivacionales de diferentes conductas, incluyendo la conducta sexual (Agmo & Berenfeld 1990; Bermant & Westbrook 1966; Coopersmith et al 1996; Gilman & Westbrook 1978; Hill & Thomas 1973; Paredes & Vazquez 1999; Peirce & Nuttall 1961b; Pfaus 1999a; Pfaus et al 2000; Pfaus et al 1999). Uno de los más utilizados ha sido el condicionamiento de preferencia de lugar. Este método es útil para estudiar los aspectos tanto reforzantes como aversivos de algunos fármacos, así como de diferentes aspectos de la cópula regulada (Agmo & Gomez 1991; Camacho et al 2004; Coria-Avila et al 2008; Fletcher et al 1993; Garcia Horsman & Paredes 2004; Gonzalez-Flores et al 2004; Hasenohrl et al 1989; Manzanedo et al 2001; Meisel & Joppa 1994; Paredes & Martinez 2001). El CPL se deriva del aprendizaje asociativo que permite evaluar los efectos de un determinado tratamiento asociándolos a las diferentes señales sensoriales (características físicas) de uno de los compartimientos de la caja de preferencia. De tal forma, que un animal que ha asociado el efecto afectivo positivo de un fármaco o un tratamiento, a un lugar específico, permanecerá más tiempo en el mismo. Así, se ha demostrado que

la conducta sexual induce un estado afectivo positivo o placentero. Ambos, hembras y machos, después del CPL permanecen más tiempo en el compartimiento asociado a la cópula (Agmo & Gomez 1991; Garcia Horsman & Paredes 2004; Paredes & Alonso 1997).

Experimentos realizados por nuestro grupo de investigación, han demostrado que ratas ovariectomizadas sexualmente inexpertas e inyectadas con benzoato de estradiol y progesterona, desarrollan un CPL cuando se les permite regular la cópula. Por el contrario, hembras que no regulan la cópula no modifican su preferencia (Garcia Horsman & Paredes 2004; Martinez & Paredes 2001; Paredes & Alonso 1997). Además, se ha demostrado que hembras que regulan la cópula necesitan de 10 a 15 intromisiones sin eyaculación para presentar un CPL (Paredes & Vazquez 1999). Existen datos que muestran que los péptidos opioides participan en la regulación de la conducta sexual tanto en ratas hembra como en machos (Agmo & Paredes 1988; Mehrara & Baum 1990; Miller & Baum 1987). Por ejemplo, los opioides endógenos liberados durante la cópula facilitan la eyaculación en el macho, lo que genera reducción en el número de intromisiones en la siguiente serie copulatoria, favoreciendo los efectos positivos del apareamiento (Agmo & Berenfeld 1990; Agmo & Paredes 1988). Además, utilizando el CPL se ha demostrado que la cópula induce un estado afectivo positivo, y que éste puede ser bloqueado por la naloxona (antagonista opioide) (Agmo & Gomez 1993; Mehrara & Baum 1990; Miller & Baum 1987), sugiriendo la participación del sistema opioidérgico durante la conducta sexual y contribuyendo a las consecuencias afectivo positivas de la cópula (Agmo & Pfaff 1999). Se ha sugerido, que la liberación de opioides podría estar mediada por dopamina ya

que ambos compuestos participan en el sistema endógeno de reforzamiento (Jenkins & Becker 2001; Miller & Baum 1987). Sin embargo, en estudios recientes hemos demostrado que la dopamina no participa en el reforzamiento de la conducta sexual de la hembra. Encontramos, que antagonistas dopaminérgicos administrados intraperitonealmente como el flupentixol y el raclopride en ratas hembras ovariectomizadas y tratadas hormonalmente, no bloquean el efecto afectivo positivo inducido por la cópula regulada (Garcia Horsman & Paredes 2004). Así mismo, antagonistas dopaminérgicos tampoco bloquean el CPL inducido por la cópula en machos. Por otro lado, el estado fisiológico inducido por la cópula en los machos (Agmo & Berenfeld 1990; Agmo & Gomez 1993), y por la cópula regulada en hembras (Paredes & Martinez 2001) se bloquea por la inyección sistémica de naloxona. De cualquier manera poco se conoce acerca de los circuitos neuronales que participan en el control de la cópula regulada en la rata hembra. Algunas de las estructuras que se han identificado como esenciales para diferentes aspectos de la conducta sexual de la rata hembra son el hipotálamo ventromedial (HVM), el área preóptica medial (APM) y la amígdala (AMG) (ver la siguiente sección). El objetivo de la presente investigación es evaluar si estas estructuras participan también en el aspecto afectivo positivo de la cópula regulada.

Capítulo 4. Control neural de la conducta sexual de la rata hembra

A pesar de la gran cantidad de estudios sobre la regulación de la conducta sexual femenina, poco se conoce sobre los aspectos neurales que traducen la estimulación durante la cópula en diferentes estados fisiológicos como los placenteros. Sin embargo el estudio de los mecanismos neurales involucrados en la expresión de la conducta sexual femenina, ha contribuido enormemente al conocimiento de la relación estructura función y su correspondiente acción hormonal. En los últimos años ha crecido el interés por entender los mecanismos de acción hormonal sobre el despliegue de la conducta sexual femenina. Así mismo, no solo el estudio del control de la conducta de lordosis sino también el estudio de los sitios neurales que regulan la expresión de la amplia gama de conductas que presenta una hembra receptiva. Las áreas cerebrales que se han estudiado son aquellas involucradas en reconocer a los estrógenos y a la progesterona, capaces de procesar la información que la hembra recibe de la estimulación de los flancos y el área ano genital, que participan en el procesamiento de diferentes intensidades de estimulación que son particulares de la cópula. La conducta de lordosis se encuentra bajo el control de diferentes áreas del sistema nervioso que incluyen el cerebro medio, el tallo cerebral y la médula espinal (Blaustein & Erskine 2002; Pfaff et al 1994). (A través de la utilización de técnicas inmunocitoquímicas que detectan la expresión de genes tempranos (*c-fos*, *Egr-1*), se ha demostrado que diferentes áreas cerebrales se activan como resultado de la estimulación que recibe la hembra durante la cópula (Figura 5).

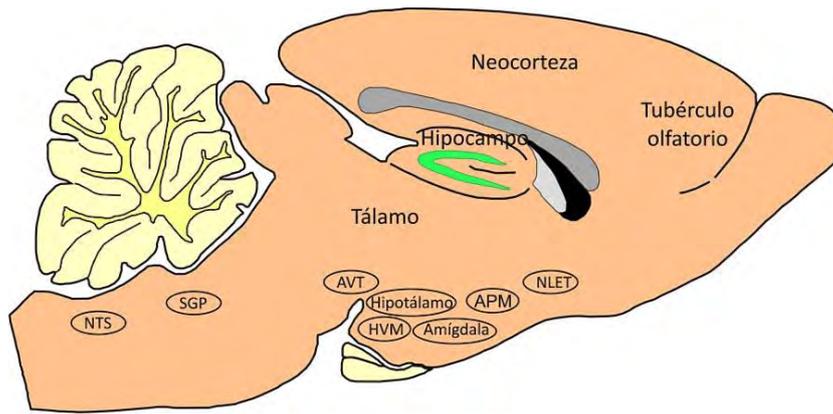


Figura 5. En círculos se marcan algunas de las estructuras que están asociadas al procesamiento de la conducta sexual en la rata hembra.

Así hembras intactas en la tarde del proestro que copularon con el macho y recibieron montas con intromisión incluyendo una eyaculación, expresaron mayor número de células inmunoreactivas a FOS que aquellas que sólo recibieron montas (Erskine 1993; Rowe & Erskine 1993). De igual manera, estudios utilizando estimulación eléctrica o en donde se realizaron lesiones citotóxicas, o de micro diálisis, así como la administración intracerebral de fármacos, han identificado algunas de las estructuras cerebrales involucradas en la regulación de la cópula en la hembra de roedores. Estas son el área preóptica medial (APM), la porción ventrolateral del hipotálamo ventro-medial (HVM), la división posterodorsal de la amígdala medial (mAMIG), la parte posteromedial del núcleo del lecho de la estría terminal (Erskine & Hanrahan 1997; Rowe & Erskine 1993), la corteza del núcleo accumbens (NACB) (Guarraci et al 2002; Jenkins & Becker 2001; Xiao & Becker 1997) y la sustancia gris central del cerebro medio (Blaustein & Erskine 2002) así como el área tegmental ventral (Frye et al 2006). Los experimentos del grupo de

Chiba y colaboradores han reportado que (Hosokawa & Chiba 2007) el APM, el HVM y la AMG son importantes para el procesamiento de las señales olfatorias provenientes del macho con experiencia sexual. Si bien, como ya fue mencionado algunas de estas estructuras han sido asociadas con el control del reflejo de lordosis, pero se desconoce su participación en el control de la cópula regulada en la rata hembra. A continuación, se describen brevemente algunas de las evidencias que demuestran la participación de estas estructuras en el control de la conducta sexual femenina.

4.1 Estructuras cerebrales y conducta sexual en la hembra.

4.1.1 Hipotálamo ventro medial

El hipotálamo ventro medial (HVM) especialmente el área ventrolateral, expresa receptores a estrógenos, progesterona, oxitocina, encefalinas, sustancia P y prolactina, entre otros, que son importantes para el despliegue de la conducta sexual femenina (Blaustein & Erskine 2002). El HVM y los grupos celulares vecinos parecen estar involucrados en la acción hormonal de la receptividad sexual, particularmente del reflejo de lordosis. La estimulación eléctrica, a través de electrodos colocados en la parte lateral del hipotálamo ventromedial de ratas hembra tratadas con estrógenos, facilita el reflejo de lordosis (Pfaff & Sakuma 1979). La estimulación vagino-cervical en hembras ovariectomizadas y tratadas hormonalmente induce un incremento de células inmunoreactivas a FOS en esta área (Erskine & Hanrahan 1997), comparadas con hembras intactas. Lesiones electrolíticas bilaterales o unilaterales del HVM disminuyen los niveles de la lordosis (Richmond & Clemens 1988), particularmente en pruebas en donde la hembra no puede escapar del macho. Sin embargo, en un estudio realizado por Emery y Moss en hembras que regulan la cópula, reportaron que la lesión del HVM disminuye los contactos sexuales, y el tiempo que pasa con un macho sexualmente activo, pero sin afectar la conducta de lordosis (Emery & Moss 1984). Se ha propuesto, que la lesión en esta área provoca una pérdida gradual en la expresión del reflejo de lordosis y que es proporcional con el tamaño de la lesión. Sin embargo, se ha sugerido que esta área no es parte del arco reflejo ya que el déficit en la lordosis se manifiesta de horas a días después de su lesión (Blaustein &

Erskine 2002). Este tipo de lesiones daña específicamente la vía lateral que conecta al HVM con el cerebro medio a través de la región peripeduncular activando la sustancia gris central, reduciendo así la expresión de la lordosis. Se ha propuesto que las lesiones en este núcleo hacen que la hembra interprete como aversivos los estímulos sensoriales emitidos por el macho lo que sugiere que bajo condiciones normales las neuronas hipotalámicas sean las responsables de codificar la información somato sensorial. Lo que sugiere, que el HVM juega un papel muy importante en la modulación de la información sensorial hormono-dependiente que se recibe para que se exprese la conducta sexual femenina (Pfaff et al 1994). Sin embargo, no se conoce la participación de esta área en el efecto afectivo positivo de la cópula regulada.

4.1.2 Área preóptica medial

El área preóptica medial del hipotálamo anterior (APM) ha sido preferentemente asociada con la regulación de la expresión de la conducta sexual masculina, en una gran variedad de vertebrados. Las lesiones de esta área eliminan la cópula en ratas macho (Paredes 2003). Sin embargo, el APM también juega un papel importante en la regulación del comportamiento sexual femenino, proponiéndose principalmente como un área cerebral inhibitoria de la expresión de la postura de lordosis (Hoshina et al 1994; Sakuma 1994; 1995). Así, en contraste con el HVM, las lesiones bilaterales del APM incrementan el reflejo de lordosis, mientras que la estimulación de la misma disminuye la expresión de esta respuesta. Interesantemente, las lesiones electrolíticas o químicas de esta área, también interfieren con algunos parámetros de la cópula

regulada. Por ejemplo, incrementan el porcentaje de salidas después de una intromisión así como también, la latencia de regreso después de una intromisión o una eyaculación (Yang & Clements 2000). También se ha comprobado, que las neuronas del APM se activan durante la cópula ya que registros de la actividad eléctrica de esta área, demuestran que diferentes tipos de neuronas cambian su actividad neural como respuesta a diferentes componentes de la cópula (Kato & Sakuma 2000). Sin embargo, los efectos de las lesiones del APM sobre la conducta sexual femenina dependen del contexto en el que se realiza la prueba. Por ejemplo, mientras que las lesiones aumentan las respuestas de lordosis en las hembras que no regulan la cópula, en hembras que si regulan la conducta sexual, las lesiones del APM reducen el tiempo que pasan con el macho, sugiriendo la disminución en la motivación sexual (Yang & Clements 2000), lo que sugiere que esta área juega un papel importante en el procesamiento de los aspectos motivacionales involucrados en la expresión normal de la conducta de estro. Al igual que en otras áreas, los efectos de la lesión de este núcleo sobre la conducta sexual están directamente relacionados con el tamaño de la lesión. Sin embargo, al igual que con el HVM el papel que el APM juega en el estado afectivo positivo de la cópula regulada no ha sido bien estudiado.

4.1.3 Amígdala

La amígdala (AMG) es una estructura que también se ha asociado con la integración de la información proveniente de la estimulación que la hembra recibe durante la cópula. Se ha demostrado que las hembras que regulan la cópula, presentan mayor número de células inmunoreactivas para FOS en la amígdala medial postero-dorsal (AMGPD), comparadas con aquellas que no regulan la cópula o que recibieron solamente montas (Erskine & Hanrahan 1997). Con base en estos y otros resultados, el grupo de la Dra. Erskine propuso que la AMGPD es una de las áreas que procesa e integra los estímulos sensoriales que provienen de la estimulación vagino-cervical que la hembra recibe durante el apareamiento, y no sólo procesa la cantidad de estimulación recibida, sino que también la calidad de la misma (Erskine & Hanrahan 1997; Erskine et al 2004). Estos datos sugieren que la actividad que la estimulación vaginocervical genera en la AMGPD puede generar actividad en otras áreas del hipotálamo importantes para el procesamiento tanto de la conducta sexual como de los cambios neuroendocrinos que esta misma conducta provoca (Figura 6).

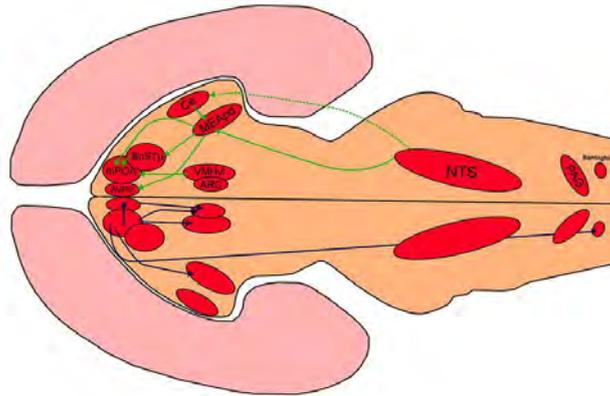


Figura 6. Representación esquemática de las posibles conexiones anatómicas de las vías que se activan como resultado de la estimulación vaginocervical. (Esquema modificado de Erskine et al 2004).

4.1.4 Estriado y núcleo accumbens

Regiones como el estriado y el núcleo accumbens, han sido asociadas a la conducta de cópula regulada en la rata hembra (Becker et al 2001; Jenkins & Becker 2001; Xiao & Becker 1997). El grupo de Becker propone que estas estructuras juegan un papel importante en el procesamiento de claves sensoriales asociadas al tipo y grado de estimulación que la hembra recibe del macho durante el apareamiento. Ellos encontraron un incremento de dopamina en estas estructuras como resultado de las intromisiones y eyaculaciones recibidas por la hembra cada vez que ésta busca al macho. Estos autores sugieren que tanto el núcleo accumbens como el estriado son estructuras asociadas al efecto reforzante inducido por el apareamiento. Sin embargo, sus resultados han sido muy discutidos, por un lado Jenkins y Becker (Jenkins & Becker 2001) proponen que las lesiones bilaterales del núcleo accumbens

interfieren con la conducta de cópula regulada. Es decir las hembras lesionadas evitan los contactos sexuales con el macho pero cuando las hembras no controlan la cópula, las lesiones parecen no tener ningún efecto: éstas muestran un comportamiento normal, cociente de lordosis normal y contactos normales. Por otro lado, las lesiones del estriado disminuyen el porcentaje de salidas después de la eyaculación esto es pasan más tiempo en el compartimento del macho contadictoriamente la lesion no afecta el porcentaje de regresos y tampoco muestran ningun deficit en la lordosis ni en su estado general de receptividad (Jenkins & Becker 2001). Es evidente que los resultados de las lesiones del accumbens y el estriado sobre la conducta sexual, no son consistentes, ya que es difícil aceptar cómo lesiones en una estructura pueden modificar un parámetro conductual como las latencias de regreso dejando intactas las latencias de salida (Guarraci et al 2002). Los autores explican esta discrepancia diciendo que las hembras pueden ser capaces de disociar entre una conducta motivante y la capacidad o habilidad de realizar una respuesta. Futuros experimentos serán necesarios para entender la participación de estas estructuras en el control de la conducta sexual.

En resumen, de acuerdo a la evidencia anterior existen diferentes áreas en el sistema nervioso central que tienen un papel preponderante en la regulación de la conducta sexual femenina. La estimulación sensorial y vagino-cervical durante el apareamiento estimula diversas estructuras del sistema nervioso, y muchas de las células en estas áreas contienen receptores a estrógenos que parecen ser el sustrato del procesamiento de las señales hormonales obtenidas como resultado de la estimulación del macho.

Capítulo 5. Trabajo de Investigación

5.1 Planteamiento de problema

Los componentes motivacionales de la cópula en la hembra han sido poco estudiados. Estudios previos muestran que los opioides participan en la conducta sexual de los machos (Agmo & Berenfeld 1990; Agmo & Gomez 1991; 1993; Agmo et al 1994; Agmo & Paredes 1988) y en el estado afectivo positivo inducido por la CR en hembras (Paredes & Martinez 2001). A pesar del gran esfuerzo en identificar las estructuras que se activan durante la estimulación sexual en la hembra, poco se conoce en relación de los eventos neurales que traducen la estimulación sexual en el estado afectivo placentero inducido por la cópula regulada. Dada la complejidad de la interacción entre los diversos estímulos sensorio motores y procesos motivacionales que participan en el apareamiento es claro que diversas estructuras cerebrales se encuentran involucradas. El propósito del presente trabajo es conocer la participación de diferentes estructuras cerebrales en los estados afectivos positivos de la copula en la hembra. Para el logro de este objetivo se administrará el antagonista opioide naloxona, en el APM, HVM, ACB o AMG evaluando su efecto en el estado afectivo positivo inducido por la cópula regulada utilizando el CPL. Esto nos permitirá identificar el circuito neuronal que se activa durante la copula en las hembras y que contribuye al estado afectivo positivo de la copula. También nos permitirá identificar si estas estructuras son diferentes a las que se activan en los machos o si existe un circuito general de reforzamiento sexual en ambos sexos.

5.2 Hipótesis

Hipótesis (1)

La naloxona administrada directamente en el área preóptica medial o en el núcleo ventromedial del hipotálamo, en ratas hembra modificará los parámetros de la cópula regulada.

Hipótesis (2)

Naloxona administrada en la amígdala o el núcleo accumbens no tendrá ningún efecto en los parámetros conductuales evaluados durante la cópula regulada.

Hipótesis (3)

La administración de naloxona en el área preóptica medial o en el núcleo ventro-medial del hipotálamo bloqueará el condicionamiento de preferencia de lugar inducido por la cópula regulada.

Hipótesis (4)

La administración de naloxona en la amígdala o en el núcleo accumbens antes de la cópula no interferirá en el condicionamiento de preferencia de lugar inducido por la cópula regulada.

Hipótesis (5)

La administración de naloxona en el área preóptica medial, en el núcleo ventromedial del hipotálamo o en la amígdala no modificara la motivación hacia un incentivo sexual.

5.3 Objetivo General

Determinar si un antagonista opioide como la naloxona administrado intracerebralmente en diferentes estructuras cerebrales, puede bloquear el CPL inducido por la cópula regulada, y/o modificar los parámetros conductuales observados en una hembra sexualmente receptiva durante la cópula con un macho sexualmente experto.

5.4 Objetivos específicos

(1) Evaluar el efecto de naloxona metil-iodada administrada en diferentes estructuras cerebrales incluyendo: el área preóptica medial (APM), el hipotálamo ventro-medial (HVM), la amígdala medial postero dorsal (AMG) y el núcleo accumbens (ACB) sobre los diferentes parámetros de la cópula regulada.

(2) Evaluar el efecto de la infusión de naloxona metil-iodada en cada una de las estructuras antes mencionadas sobre el condicionamiento de preferencia de lugar inducido por la cópula regulada.

(3) Realizar pruebas de motivación sexual hacia un incentivo, después de la infusión de naloxona en el aquellas áreas cerebrales en las cuales este fármaco haya tenido un efecto.

5.5 Método

5.5.1 Animales

En todos los experimentos se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar sin experiencia sexual, con un peso entre 250 y 350 gramos mantenidas con un ciclo invertido con las luces encendidas de las 9:00 AM a las 21:00 PM (12 h luz-12 h oscuridad), a una temperatura promedio de 22° C y con acceso libre a comida y agua. Las pruebas fueron realizadas en el período de oscuridad. Para la prueba de cópula regulada se utilizaron como animales estímulo machos Wistar sexualmente expertos entre 300 y 350 gramos.

Dos semanas después del implante de la cánula (ver cirugía), los animales fueron aislados en cajas individuales (42 cm de ancho x 62 cm de largo y 29 de profundidad), para prevenir que otros animales mordieran las cánulas. Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo al Reglamento de la ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, del Ministerio Mexicano de la Salud que sigue los lineamientos del adecuado para el uso de animales en investigación.

5.5.2 Aparatos

Caja de Cópula Regulada (CR)

Para evaluar la cópula regulada se utilizó una caja de acrílico transparente de (40cm X 60cm X 40cm) con aserrín en el piso (ver Figura, 7). La caja está dividida en dos compartimientos por una división con un orificio en la parte inferior de 4 cm de diámetro. Debido al tamaño de la hembra, ésta puede pasar a través del orificio y cambiar de compartimiento libremente, el macho por el contrario, al ser de tamaño más grande a no puede cruzar, y está

forzado a mantenerse en un solo compartimiento. De esta manera, la hembra puede regular la cópula, es decir, entrar al compartimiento donde está el macho, recibir cualquier estimulación y salir del mismo tantas veces como lo desee.



Figura 7. Caja de cópula en donde la hembra regula los contactos con el macho. La hembra puede cruzar al comportamiento del macho a través de un orificio por el cual el macho por su tamaño no puede pasar, de tal forma que solo la hembra puede controlar los contactos con el macho.

Caja de preferencia de lugar

La prueba para evaluar la preferencia de lugar se realiza en una caja de acrílico con tres compartimientos. El compartimiento central (22 X 24 X 32 cm) es de color gris y tiene dos puertas deslizables de 10 X 10 cm. a los lados que comunican a los compartimientos laterales. Al frente tiene una malla de alambre por donde el animal puede ser observado. Los compartimientos laterales tienen las mismas dimensiones (27 X 37 X 32cm). Ambos compartimientos ofrecen diferentes claves sensoriales: color, olor y textura, que serán asociadas al tratamiento experimental de acuerdo a la caja preferida de cada animal. Uno es de color blanco, tiene viruta de aserrín en el piso y es inodoro, el otro compartimiento es de color negro, el piso es liso y las paredes se impregnan con una solución de ácido acético glacial al 2% en agua destilada (puede ser usado cualquier otro olor), antes de colocar al animal, (ver Figura, 8). Durante

el condicionamiento el animal asocia el estado afectivo provocado por un fármaco u otro tratamiento a las características físicas del compartimiento.



Figura 8. Caja donde se evalúa el condicionamiento de preferencia de lugar. Tiene dos compartimentos laterales con claves sensoriales diferentes; color, textura y olor y que asociadas al estado fisiológico del sujeto puede inducir condicionamiento de preferencia de lugar.

Caja de motivación hacia un incentivo sexual

Para evaluar la motivación hacia un incentivo sexual se utiliza una caja de acrílico negro de 100 x 50 x 45 cm. A cada lado de la caja a nivel del piso y en sentido opuesto se encuentran dos orificios de 25 x 25 cm a los cuales se anexan unas cajas en donde se coloca al animal incentivo (Figura 9). Estas cajas miden 15 cm de largo x 25 cm de ancho x 25 cm de altura, y están temporalmente fijadas por fuera de la pared de la arena. Al frente de cada una de estas cajas que da hacia la parte en donde se localiza la arena, contiene orificios pequeños que le permiten al animal experimental ver oler, pero le impiden tocar al animal incentivo. Aproximadamente 2 m por arriba y al centro de la caja se colocada en el techo del cuarto se encuentra una cámara de video conectada a una computadora. Así la actividad y la posición del sujeto experimental se registra a través de un sistema de video, Ethovision Noldus Wageningen, Holanda. Al frente de cada caja en donde se coloca el animal incentivo, se establece un área denominada zona incentivada (20 cm²). El

programa registra el tiempo que pasa el sujeto experimental en esta área y se interpreta como el grado de motivación hacia un incentivo (Agmo 2003).



Figura 9. Caja de motivación hacia un incentivo donde se evalúa el tiempo que pasa un sujeto en la zona incentiva que es el área marcada frente a los compartimentos en donde se encuentran los estímulos.

5.5.3 Fármacos

Se administró yoduro de N-metilnaloxona (5 µg / cánula) ya que este compuesto es menos lipofílico (que el comúnmente utilizado clorhidrato de naloxona), por lo que su difusión es más lenta y permanece en el sitio de la infusión por un período más prolongado, con lo que se garantiza que el compuesto ejercerá suficiente y prolongado efecto. Además, el grado de afinidad que muestra este compuesto por su receptor es de un 5% mayor que el del clorhidrato de naloxona (Brown & Goldberg 1985). El compuesto fue disuelto en solución fisiológica a una concentración de 5 µg/ml y se administró a través de la cánula, en un volumen de 1 µl/cánula.

La infusión se llevo a cabo mientras el animal permanecía en libre movimiento dentro de la caja de confinamiento. Para asegurar la difusión del fármaco, el inyector sobresalió 1.0 mm de la punta de la cánula guía y permaneció en el sitio durante dos minutos después de terminada la infusión. Posteriormente fue retirado.

5.5.4 Procedimiento experimental

Cirugía

Los animales fueron anestesiados con una mezcla de Ketamina (95 mg/Kg) y Xylazina (12 mg/Kg) administrada intraperitonealmente (ip). Posteriormente, los sujetos fueron bilateralmente implantados con cánulas guía de acero inoxidable de 22- gauge (Plastics One, Roanoke, VA), en una de las áreas cerebrales de acuerdo a las siguientes coordenadas establecidas por el atlas de Paxinos & Watson: área preóptica medial (APM), 0.5 mm lateral a la línea media, -0.2 mm posterior con respecto a Bregma y -7.1 mm dorso-ventral a partir de la dura madre; amígdala medial (AMG), 3.5 mm lateral, -3.1 mm antero posterior con respecto a Bregma y -8.4 mm de profundidad; hipotálamo ventro medial (HVM), 0.5 mm lateral, -2.4 mm con respecto a Bregma y -8.0 mm dorso ventral o el núcleo accumbens (ACB) -6.2 mm de profundidad y 1.5 mm lateral +1.7 mm antero posterior con respecto a Bregma (Paxinos & Watson 2005). Las cánulas fueron implantadas colocando al cráneo sobre el

estereotáxico (STOELTING) en un plano cero y se fijaron a éste con tres tornillos y cemento dental. Inmediatamente después del implante de las cánulas, las ratas fueron ovariectomizadas bilateralmente. Después de las cirugías todos los animales recibieron una inyección de antibiótico (0.3 ml de penicilina G procaína, Virbac SA de CV México) para prevenir cualquier tipo de infección.

5.5.5 Tratamiento hormonal

A los cinco días después de las cirugías para inducir la receptividad las hembras recibieron inyecciones subcutáneas de benzoato de estradiol (EB) (25 µg/rata) 48 h y progesterona (P) (1mg/Kg.) 4 h antes de la prueba de conducta sexual. Los esteroides fueron disueltos en aceite de maíz e inyectados en un volumen de 0.2 ml/rata. Las hormonas fueron adquiridas de Sigma (St. Louis, MO).

5.5.6 Diseño

Para el experimento 1 y 2 se utilizaron siete grupos. El primer grupo fue implantado bilateralmente con cánulas en el APM (n = 16), el segundo grupo implantado en el HVM (n = 18), el tercero canulado en la AMG (n = 12), y el cuarto en el núcleo ACB (n = 8). Se utilizaron dos grupos controles, uno al que se le administró NaCl: en el APM (n=5), en el HVM (n=5), en la AMG (n=3) y en el núcleo ACB (n=2). Al otro grupo control se le colocó la cánula pero no se le realizó infusión alguna; 3 animales con cánula en el APM, 2 en el HVM, 1 en la AMG, y 1 en el ACB. La razón por la cual se agregó este grupo fue para descartar que el implante de la cánula tuviera algún efecto por sí mismo.

Después de la localización de la punta de la cánula en los tejidos cerebrales, se incluyó otro grupo formado por aquellos animales en los que la cánula quedo fuera del sitio (n = 14), 6 del APM y 8 del HVM. Los primeros cuatro grupos experimentales recibieron una infusión intracerebral de yoduro de N-metilnaloxona antes de la prueba de conducta sexual.

Para el experimento 3 se utilizaron tres grupos de hembras canuladas: en el APM (n = 10), HVM (n = 9) o AMG (5) que son las estructuras en las que la naloxona bloqueó el efecto inducido por la cópula regulada en los experimentos de CPL.

Todos los experimentos fueron realizados durante la fase de oscuridad del ciclo invertido. Antes de los experimentos todos los animales fueron manipulados durante tres sesiones de 10 minutos diarios. Y posteriormente se les manipuló dos veces más simulando la infusión, con el objeto de disminuir al máximo el estrés inducido por el procedimiento. Para todos los experimentos se utilizaron hembras OVX inyectadas con benzoato de estradiol y progesterona para inducir el estro conductual.

5.6 Experimento 1. Conducta Sexual

Primeramente se evaluaron los efectos de la naloxona sobre la conducta sexual de las hembras (tratadas hormonalmente) durante la cópula regulada. Las hembras fueron implantadas con cánulas en el APM, HVM, AMG y ACB, se les administró 1µl de yoduro de N-metilnaloxona (5 µg / ml) disuelto en solución salina a una velocidad de 0.5 µl/min y se evaluó la conducta sexual regulada (Figura 10).

5.6.1 Procedimiento

Para la prueba de conducta sexual, se colocó al macho estímulo en un compartimiento de la caja de cópula regulada, 2 minutos antes de colocar a la hembra en el compartimiento opuesto. Durante la cópula se registraron las siguientes conductas masculinas: latencias de monta (tiempo transcurrido desde que se introduce a la hembra hasta la primera monta); latencia de intromisión (tiempo desde que se introduce a la hembra hasta la primera intromisión); y latencia de eyacuación (tiempo transcurrido desde que la hembra recibe la primera intromisión hasta la primera eyacuación); en las hembras se midió; la latencias de regreso después de montas e intromisiones; número de montas e intromisiones recibidas, cociente de lordosis (número total de respuestas de lordosis/ el número total de montas + intromisiones recibidas

x 100); intensidad de lordosis (en donde se asigna: 0 = no lordosis, 1 = lordosis media, y 2 = lordosis completa); intensidad media de lordosis (suma de los puntos de la intensidad media de lordosis entre el número de montas e intromisiones recibidas); porcentaje de salidas del compartimiento del macho después de una monta o una intromisión y latencia de regreso después de la eyaculación. La prueba terminó después de 15 intromisiones con o sin eyaculación (Figura 10).

Posteriormente se realizó el condicionamiento de preferencia de lugar. Al término de los experimentos las hembras fueron sacrificadas para obtener los cerebros para su análisis.

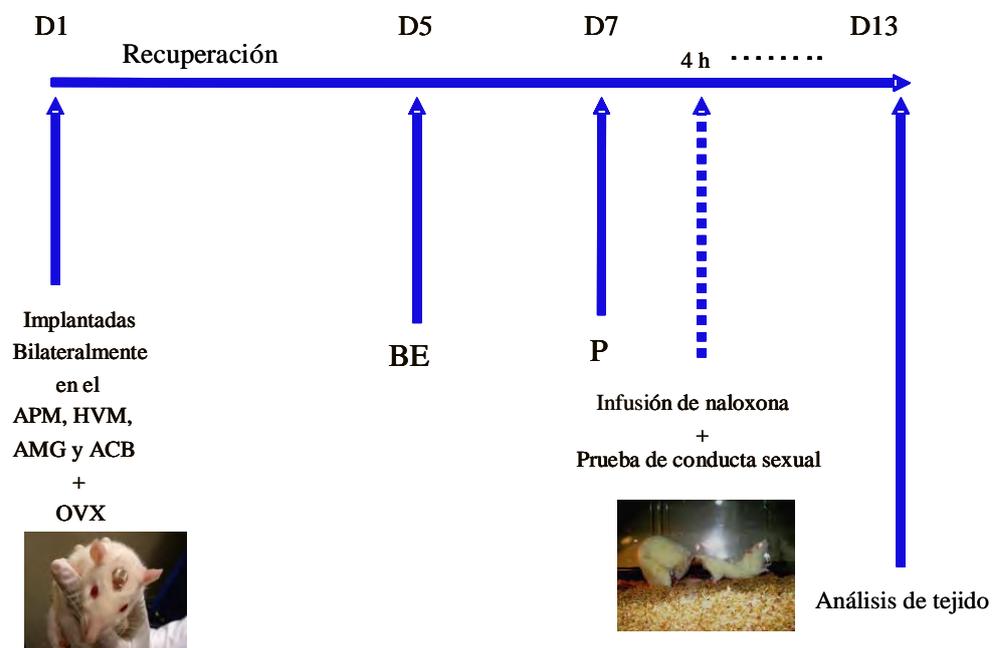


Figura 10. Esquema que ejemplifica el procedimiento seguido para el experimento 1 donde se evaluaron los efectos de la Naloxona sobre la conducta sexual femenina después de que se administro en diferentes áreas cerebrales.

5.7 Experimento 2. (CPL)

5.7.1 Procedimiento

El condicionamiento se realizó en ocho sesiones. En la primera sesión o preprueba se determina la caja preferida. Para ello el sujeto es colocado en el compartimiento del centro por un minuto, posteriormente las puertas deslizables se retiran y se toma el tiempo que el animal permanece en cada uno de los compartimientos laterales para determinar cuál es el preferido. Esta prueba dura diez minutos. Al día siguiente, todos los grupos recibieron una infusión de solución fisiológica y posteriormente cada animal fue colocado en la caja preferida (no reforzada) de condicionamiento por 30 minutos. En las sesiones reforzadas las hembras recibieron una infusión de yoduro de N-metil naloxona e inmediatamente fue transferida cada una a la caja de cópula. Después de recibir el número preestablecido de intromisiones fueron cuidadosamente colocadas una a una en el compartimiento no preferido (reforzado) por 30 minutos. En días alternos, después de recibir una infusión de solución fisiológica, los sujetos fueron colocados en la caja preferida por 30 minutos. Al término de estas seis sesiones diarias de condicionamiento, se realizó la prueba exactamente igual a la preprueba.

El intervalo entre la última sesión de condicionamiento y la prueba fue siempre de 24hrs (ver Figura 11).

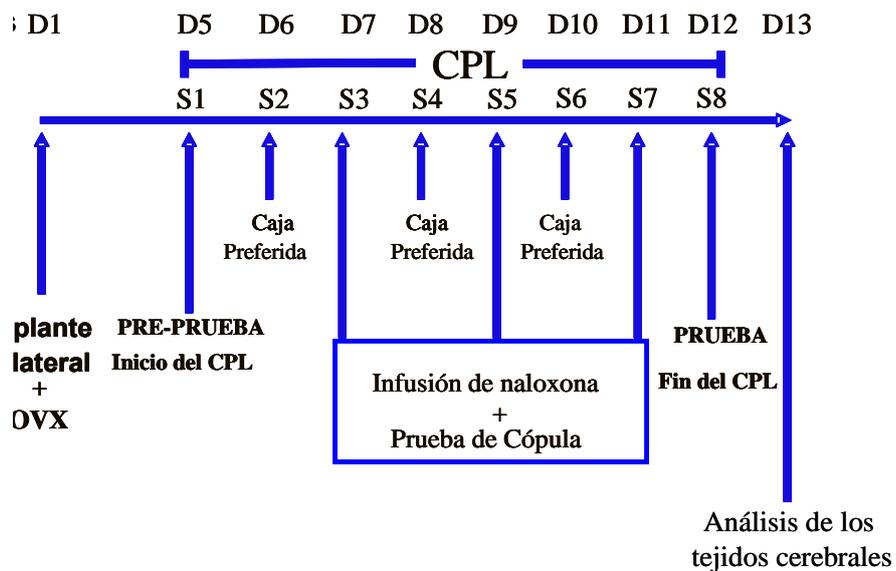


Figura 11. Esquema de tiempo utilizado para evaluar el CPL. En el día (D) 1 los sujetos fueron bilateralmente implantados y ovariectomizados. En el D 5 o S (sesión) 1 se realizó la Pre-prueba, en la S 2, 4 y 6 los sujetos fueron colocados en la caja preferida. En la S 3, 5, y 7 a los animales se les administró una infusión de naloxona antes de la prueba de cópula y fueron colocados en la caja no-preferida. La Prueba del CPL se realizó en la S 8 D 12. Todos los animales fueron sacrificados el D 13 para su análisis.

5.8 Experimento 3. Motivación hacia un incentivo.

5.8.1 Procedimiento

El procedimiento fue igual al descrito por Agmo, una área grande con dos animales estímulo atrás de una malla en los extremos de la caja (Agmo 2003) ver Figura 7. Después de que los animales se recuperaron de la cirugía y antes de la prueba, las hembras fueron habituadas a la caja de motivación sexual incentivada, estas fueron colocadas en el área central con los compartimentos para los estímulos incentivos vacíos durante tres sesiones consecutivas de 10 minutos. Como sujetos estímulo se utilizó a un macho castrado y a un macho sexualmente experto que fueron colocados aleatoriamente en los compartimentos externos de la caja de motivación. La posición de los animales incentivo fue aleatoriamente cambiada durante las sesiones. El sistema de video determinó el tiempo que el sujeto experimental permanecía en cada zona incentivada y la distancia total recorrida durante la prueba.

Diez hembras implantadas en el APM, 9 en el HVM y 5 en la AMG, recibieron una infusión al igual que en el experimento anterior y bajo las mismas condiciones, de 1 µl de naloxona o NaCl. Después de la infusión, las hembras fueron colocadas en la caja de motivación con los animales incentivo. Todos los animales fueron evaluados en dos ocasiones consecutivas, una por semana, es decir a los mismos sujetos de cada grupo que se les administró NaCl, posteriormente, fueron evaluados nuevamente con naloxona, de tal forma que cada sujeto fue su mismo control. Se tomó el tiempo que permanecieron en la zona incentivada durante los 10 minutos que duraba la prueba.

Los resultados fueron evaluados en términos del índice de preferencia, es decir, el tiempo que pasaron en la zona incentivada con el macho experto dividido entre la suma del tiempo que pasaron con el macho experto, más el tiempo que pasaron en la zona incentivada del macho gonadectomizado.

Los datos del condicionamiento de preferencia de lugar fueron evaluados utilizando una prueba ANOVA de medidas repetidas de 2 (sesión) X 7 (grupo), y una prueba post-hoc Fisher's LSD. Finalmente, los datos de la motivación

incentiva fueron evaluados utilizando una prueba ANOVA de medidas repetidas de 2 (sesión) X 3 (grupo).

5.9 Análisis del tejido cerebral

Al final del experimento los animales fueron sacrificados para realizar el análisis microscópico de los tejidos. Se les administró una sobredosis de pentobarbital y fueron perfundidos intra-cardialmente con solución salina al 0.9% seguida de formalina al 10%. Se removieron los cerebros y fueron colocados en sacarosa al 30% hasta el momento de ser cortados. Se obtuvieron cortes coronales de 45 μm , y posteriormente fueron teñidos con violeta de cresilo. La posición en la que quedó la cánula fue verificada al microscopio por dos observadores independientes. Se consideró como sitio de implante correcto, cuando la punta de la cánula se observó 1 mm arriba de la estructura en la que se pretendió implantar la cánula (Figura 12).

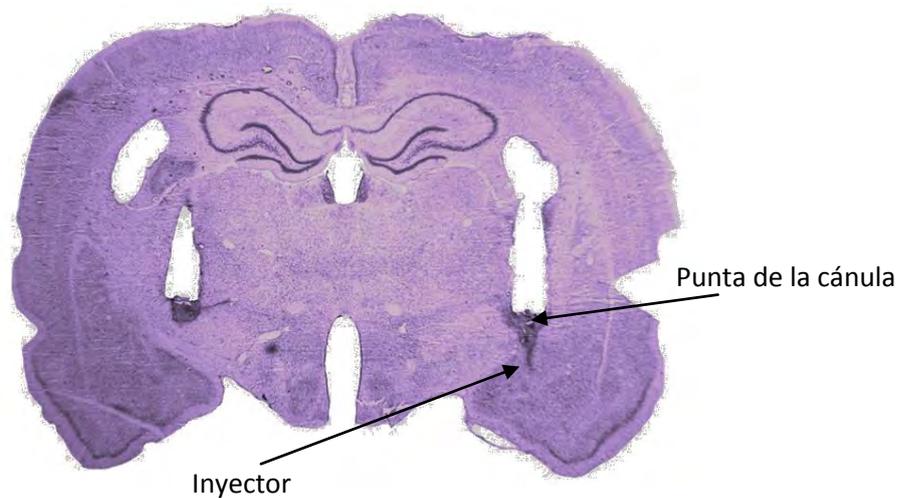


Figura 12. Corte de tejido coronal a nivel de la amígdala indicando el lugar de la infusión (inyector) y el sitio de la punta de la cánula.

5.10 Análisis estadístico

Los datos de la conducta sexual se evaluaron utilizando una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc de Newman-Keuls.

Para evaluar el condicionamiento de preferencia de lugar se utilizaron dos criterios: Tiempo en el compartimiento reforzado y el Índice de preferencia. El tiempo en el compartimiento reforzado (T_1) se establece por la diferencia entre el tiempo que pasa en el compartimiento reforzado durante la pre-prueba y la prueba.

El segundo criterio es el índice de preferencia (IP)

$$IP = \frac{T_1}{T_1 + T_2}$$

T_1 = tiempo en el compartimiento reforzado o no preferido

T_2 = tiempo en el compartimiento no reforzado o preferido

Ambas medidas deben aumentar entre la pre-prueba y prueba.

Los datos del CPL fueron evaluados utilizando una prueba de ANOVA de medidas repetidas de 2 (sesión) X 7 (grupo), y una prueba post-hoc Fisher's LSD.

Finalmente, los datos de la motivación incentiva fueron evaluados utilizando una prueba de ANOVA de medidas repetidas de 2 (sesión) X 3 (grupo).

5.11 RESULTADOS

5.11.1 Análisis de los tejidos

En la Figura 13 se muestran los cortes coronales de las estructuras con los diferentes sitios donde se implantaron las cánulas. Los círculos pequeños indican la localización de la punta de la cánula de acuerdo a las observaciones al microscopio. De los animales que se canularon en el APM 6 cayeron fuera de esta área y en 8 de los animales del grupo canulado en el HVM la cánula se localizó anterior o posterior al área, por lo que se formó un grupo nuevo al que se le denominó fuera del área (Fuera N = 14). El total de sujetos para los grupos de APM y de HVM fue de 10. Para el grupo de Accumbens el total fue de 8 y para la Amígdala medial el total de animales fue de 12.

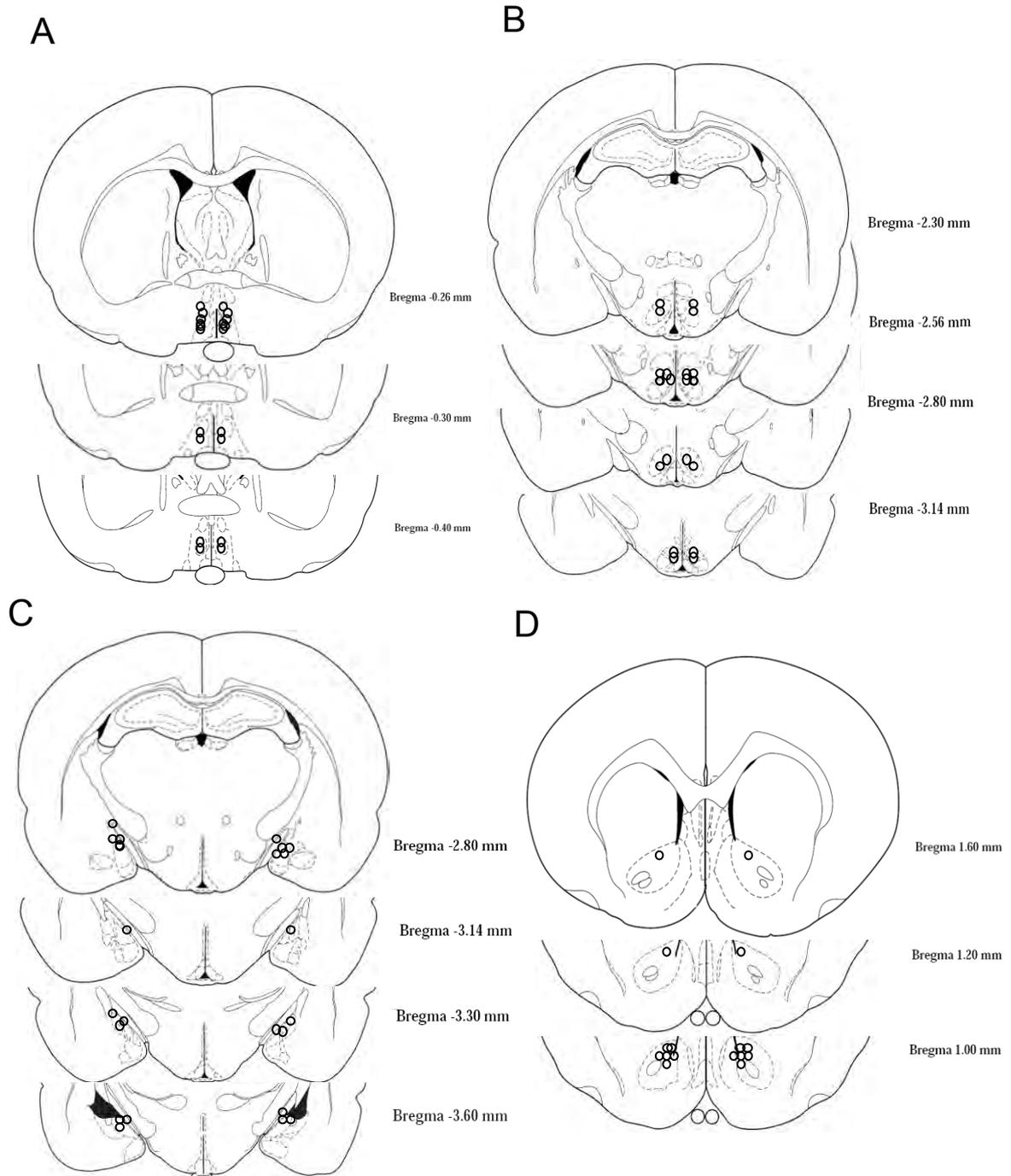


Figura 13. Cortes coronales en los que se indica con círculos pequeños el lugar en que se localizó la punta de la cánula. (A) Área preóptica medial (APM n = 10); (B) Núcleo ventro medial del hipotálamo (HVM n = 10); (C) Amígdala (AMG n = 12); (D) Núcleo accumbens (ACB n = 8). A la derecha de los esquemas se indica la distancia con respecto a Bregma de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (Paxinos & Watson 2005).

5.11.2 Experimento 1

Conducta sexual

Como puede observarse en la **Tabla 1 y 2**. La infusión de N-metil naloxona en las diferentes áreas en general no modificó los parámetros evaluados durante la prueba de conducta sexual. Solamente la latencia de monta en los animales con la cánula en el APM se incremento significativamente.

Tabla 1. Conducta sexual de las ratas hembras en todos los grupos. Hembras control con cánula sin infusión (CA); hembras con cánula inyectadas con NaCl (NaCl). Además, cinco grupos de hembras inyectadas con naloxona: fuera del área que se intento implantar (Fuera); en el área preóptica medial (APM), en el hipotálamo ventro medial (HVM), en el núcleo accumbens (ACB) y en la Amígdala medial (AMG). Los parámetros conductuales que se registraron fueron: latencia de monta (LM), latencia de intromisión (LI), intensidad media de lordosis (IML), coeficiente de lordosis (QL), latencia de regreso después de monta (LRM), latencia de regreso después de intromisión (LRI), el % de salidas después de monta (%SM) y el % de salidas después de una intromisión (%SI). Todos los datos están expresados en segundos: medias \pm EE.

Conducta	Grupos						
	CA n = 7	NaCl n = 15	Fuera n = 14	N-metil naloxona			
				APM n = 10	HVM n = 10	ACB n = 8	AMG n = 12
LM	69 \pm 15	40 \pm 7	58 \pm 10	158 \pm 42 *	109 \pm 20	57 \pm 10	78 \pm 25
LI	139 \pm 43	145 \pm 45	144 \pm 31	208 \pm 43	176 \pm 39	155 \pm 34	92 \pm 26
IML	1.9 \pm 0.07	1.8 \pm 0.05	1.74 \pm 0.1	1.8 \pm 0.07	1.7 \pm 0.08	1.9 \pm 0.04	1.8 \pm 0.08
QL	100 \pm 0.3	94 \pm 3	94 \pm 2	94 \pm 3	90 \pm 4	97 \pm 2	95 \pm 3
LRM	20 \pm 10	13 \pm 2	30 \pm 7	17 \pm 4	17 \pm 4	20 \pm 6	24 \pm 6
LRI	24 \pm 3	28 \pm 3	62 \pm 14	38 \pm 6	64 \pm 19	43 \pm 12	37 \pm 4
%SM	17 \pm 5	24 \pm 3	28 \pm 5	24 \pm 5	30 \pm 8	28 \pm 3	37 \pm 6
%SI	49 \pm 9	43 \pm 6	43 \pm 5	53 \pm 7	48 \pm 6	60 \pm 5	61 \pm 4

* Diferente de los grupos CA, NaCl, Fuera, ACB, AMG.

Conducta	F	P
LM	F(6,75) = 3.8	p = 0.002
LI	F(6,75) = 0.8	p = 0.5
IML	F(6,75) = 0.7	p = 0.6
QL	F(6,75) = 0.9	p = 0.5
LRM	F(6,73) = 1.2	p = 0.3
LRI	F(6,75) = 2.3	p = 0.06
%SM	F(6,73) = 1.3	p = 0.3
%SI	F(6,75) = 1.6	p = 0.2

Tabla 2. Resultados de la prueba ANOVA. Sólo los resultados de la latencia de monta en los animales con cánula en el APM fueron diferentes significativamente a los otros grupos p = 0.002.

5.11.3 Experimento 2 (CPL)

Caja Reforzada

El ANOVA de la diferencia entre el tiempo en la caja reforzada y el tiempo en la caja no reforzada, reveló un efecto significativo de la sesión, [F(1,147) = 15.88, p < 0.001] y de la interacción de grupo X sesión, [F(6,147) = 3.5, p = 0.005]. Al analizar los efectos principales simples, no se encontraron diferencias significativas en el efecto de grupo, [F(6,147) = 1.66, p = 0.14]. El análisis de los resultados de la prueba post-hoc mostró un incremento significativo en el tiempo que los animales pasaron en el compartimento reforzado de los grupos: de hembras implantadas con la cánula y que no recibieron infusión alguna, en el grupo de hembras con infusión de solución salina, en el grupo implantado con la cánula fuera del área y en el grupo con infusión de naloxona en el ACB. Los grupos con infusión de naloxona en el APM, HVM y AMG no mostraron aumento significativo en el tiempo que pasaron en la caja reforzada después del condicionamiento (Figura 14).

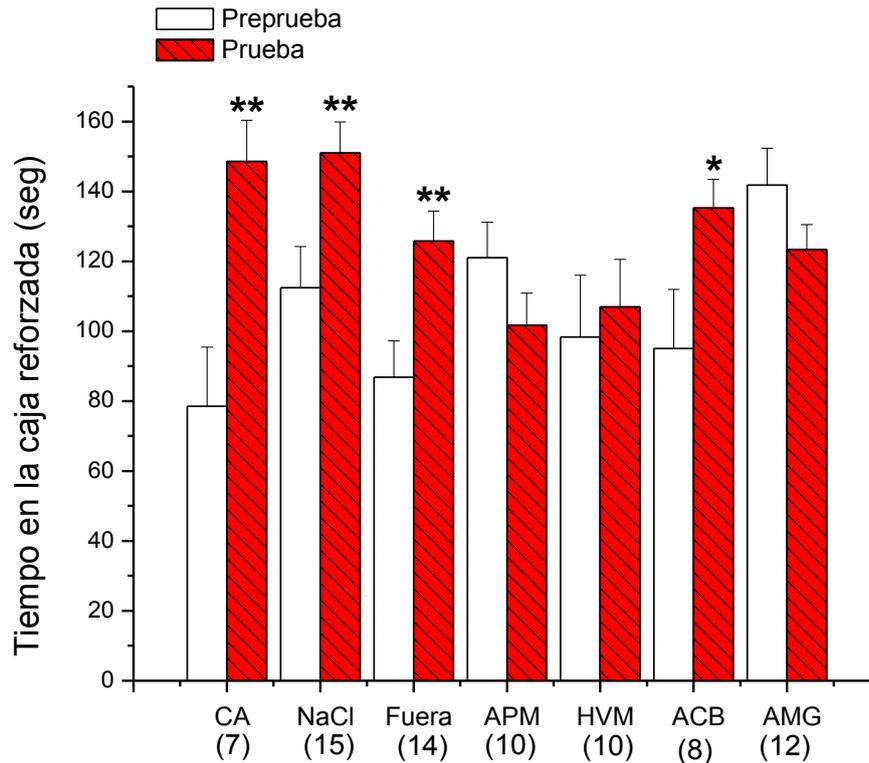


Figura 14. Caja reforzada. Tiempo que pasan los sujetos en la caja reforzada entre la pre-prueba y la prueba. Hembras control con cánula sin infusión (CA); hembras con cánula inyectadas con NaCl (NaCl); hembras inyectadas con naloxona: fuera del área que se intentó implantar (Fuera); en el área preóptica medial (APM), en el hipotálamo ventro medial (HVM), en el núcleo accumbens (ACB) y en la Amígdala medial (AMG). En esta y todas las graficas, el número de animales por cada grupo esta indicado entre paréntesis. Los datos son expresados como medias \pm EE. * Diferente de la pre-prueba * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

Índice de preferencia

El análisis estadístico del índice de preferencia reveló un efecto significativo de la sesión, [$F(1,147) = 69.9, p < 0.0001$] y de la interacción de grupo X sesión, [$F(6,147) = 5.9, p < 0.0001$], pero no de grupo, [$F(6,147) = 2.1, p = 0.06$]. La prueba de Fisher's LSD mostró un incremento significativo en el índice de preferencia en el grupo de sólo cánula, del que recibió la infusión de solución salina, el grupo con la cánula implantada fuera del área y el grupo con infusión de naloxona en el núcleo accumbens. Estos resultados se muestran en la Figura 15. Es interesante observar que los grupos tratados con naloxona en el APM, HVM y AMG no mostraron incremento en el índice de preferencia, es decir ningún cambio de preferencia.

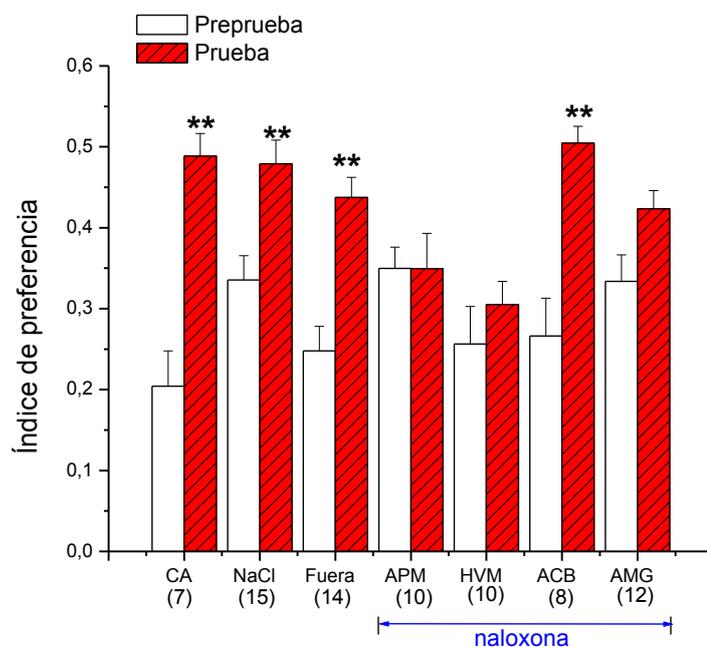


Figura 15. El índice de preferencia en los diferentes grupos. Este valor tiende a aumentar de la pre-prueba a la prueba e indica un claro cambio de preferencia. Hembras control con cánula sin infusión (CA); hembras con cánula a las que se les administró NaCl (NaCl); o naloxona: fuera del área que se intentó implantar (Fuera); en el área preóptica medial (APM), en el hipotálamo ventro medial (HVM), en el núcleo accumbens (ACB), y en la Amígdala medial (AMG). Los datos son expresados como medias \pm EE. * Diferente de la pre-prueba * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

Estos resultados muestran que la naloxona bloquea el condicionamiento de preferencia de lugar inducido por la cópula regulada cuando se inyecta directamente en el APM, en el HVM y en la AMG. Mientras que no se bloquea el condicionamiento cuando la naloxona es inyectada en el ACB.

Los resultados obtenidos hasta ahora sugieren que el APM, el HVM y la AMG podrían ser estructuras importantes que participan en el estado afectivo positivo inducido por la cópula regulada.

5.11.4 Experimento 3

Motivación hacia un incentivo

El análisis estadístico del índice de preferencia hacia un incentivo no reveló ninguna diferencia significativa entre los grupos ni los tratamientos [grupo $F(2,47) = 0.846$; $p = 0.44$; tratamiento $F(1,47) = 0.0125$, $p = 0.912$ y de la interacción de grupo X tratamiento, $F(2,47) = 0.21$, $p = 0.811$]. Las hembras que recibieron la infusión de NaCl prefirieron al macho experto al igual que las hembras a las que se les administró naloxona, los resultados se muestran en la Figura 16.

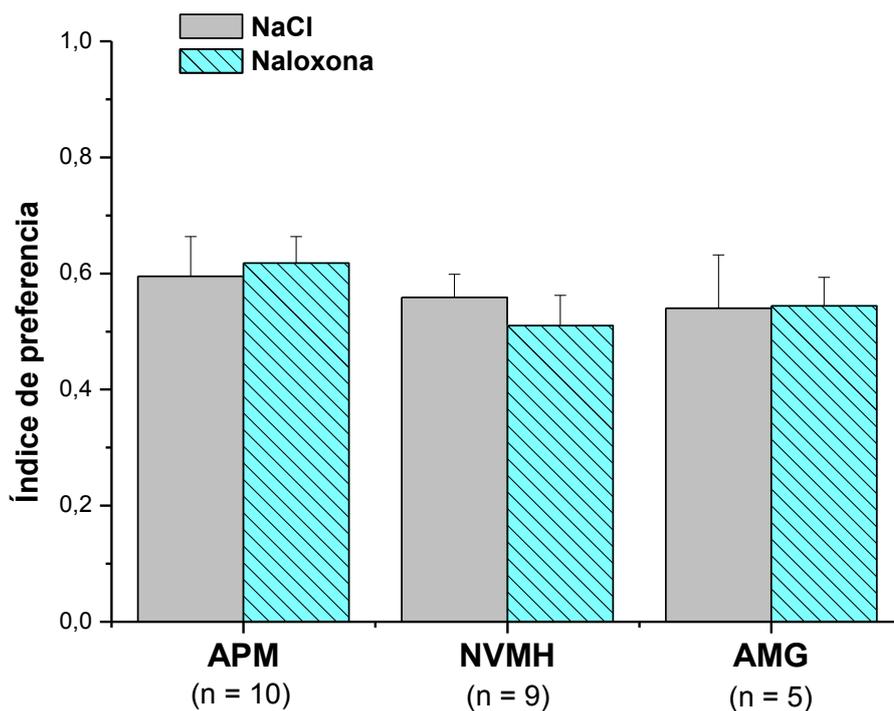


Figura 16. Índice de preferencia de la motivación hacia un incentivo en dos sesiones consecutivas. Hembras control con cánula en el área preoptica medial (APM), en el hipotálamo ventro medial (HVM), y en la amígdala (ACB) que recibieron infusiones de NaCl (NaCl) y de naloxona. Los datos son expresados como medias \pm EE.

A pesar de que el número de animales en el grupo con cánula en la amígdala, comparado con el número de sujetos de los otros dos grupos, es reducido, es posible observar que el efecto de la naloxona en el APM, en el HVM y en la AMG no parece tener efecto alguno en la motivación de las hembras para preferir estar en la compañía de un macho experto vs un macho gonadectomizado.

Capítulo 6. Discusión

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran la existencia de un circuito neuronal, mediado por opioides, en el que el APM, el HVM y la AMG son fundamentales para el estado afectivo positivo inducido por la cópula regulada. Nuestros datos confirman también, observaciones previas en donde se muestra que las hembras a las que se le permiten regular los contactos con el macho, presentan un CPL asociado a este tipo de cópula (García Horsman & Paredes 2004; González-Flores et al 2004; Martínez & Paredes 2001; Paredes & Alonso 1997; Paredes & Vázquez 1999). Esto significa que la cópula regulada induce un estado fisiológico afectivo positivo capaz de producir un cambio de preferencia de lugar, como en el caso de los grupos que sólo fueron canulados a los que se les administró NaCl, y en los que la cánula quedó fuera del área de interés. Todos estos grupos mostraron un incremento en el tiempo que pasaron en el compartimiento asociado a la cópula regulada y consecuentemente un incremento en el índice de preferencia. Esto indica que ni el implante de la cánula ni la infusión de salina tienen efecto *per se*. Por el contrario, las hembras que recibieron la naloxona en el APM, el HVM o en la AMG, no cambiaron de preferencia después de regular la cópula. Esto sugiere que el efecto fisiológico, en este caso la liberación de opioides como resultado de la cópula regulada, fue bloqueado por la naloxona. Además, no se observó un incremento en el tiempo en la caja reforzada ni en el índice de preferencia en ninguno de estos tres grupos. Estos resultados muestran que la naloxona administrada en el APM, el HVM y la AMG, puede bloquear el efecto afectivo positivo inducido por la cópula regulada, lo que sugiere que los opioides en estas estructuras participan en el estado placentero inducido por la cópula regulada. Por otro lado, no se modificó ninguno de los parámetros conductuales que presentaron las hembras y que se evaluaron durante la cópula. La intensidad media de lordosis, el coeficiente de lordosis, la latencia de regreso después de monta y la latencia de regreso después de intromisión no se modificaron. Esto significa que aún cuando la naloxona puede bloquear el efecto afectivo positivo de la cópula regulada, no parece tener ningún efecto en el despliegue de la conducta sexual femenina. Estos datos apoyan los estudios en los que se ha reportado que el APM participa de manera

importante en respuesta a la estimulación vagino-cervical que la hembra recibe del macho. Por ejemplo, se conoce que genes de expresión temprana como *c-fos* son activados en esta región como resultado de las intromisiones (Polston & Erskine 1995; Rowe & Erskine 1993). Las lesiones electrolíticas y químicas del APM, incrementan tanto el número de salidas como la latencia de regreso después de varias intromisiones o eyaculaciones, en la cópula regulada. Además, se ha reportado que estas hembras permanecen menos tiempo cerca del macho, aún cuando la expresión de la conducta de lordosis no parece afectarse (Guarraci et al 2004; Yang & Clements 2000). Las hembras lesionadas en esta área no sólo permanecen lejos del macho, sino que prefieren el olor de un macho castrado al de un macho experto (Xiao et al 2005). Asimismo, se ha descrito que las conductas proceptivas, como conductas de solicitud, se reducen como resultado de la lesión del área preóptica medial (Hoshina et al 1994), a pesar de que en estos estudios se evalúa a la conducta sexual como tal y no al efecto fisiológico inducido por ésta. Los datos de este trabajo podrían sugerir que las hembras presentan un estado motivacional disminuido. Los resultados obtenidos de los experimentos del presente trabajo de tesis, proponen que para que el apareamiento regulado resulte placentero es necesaria la acción opioidérgica en el APM. Nuestros resultados concuerdan con las observaciones obtenidas en las ratas macho en donde infusiones de naloxona en esta misma área, bloqueó el CPL que produce la eyaculación (Agmo & Gomez 1993). Incluso, la administración de encefalinas en esta área también induce un cambio de preferencia (Agmo & Gomez 1991), lo que sugiere que la activación de los receptores a opioides en el APM contribuye a que la cópula resulte placentera. Los resultados del presente trabajo apoyan nuestra hipótesis de que la liberación de opioides durante la cópula contribuye al estado afectivo positivo tanto en machos como en hembras.

Otra estructura que se ha considerado esencial para la conducta sexual femenina es el HVM (Blaustein & Erskine 2002; Devidze et al 2008; Pfaff 1980; Pfaff 1999; Pfaff & Sakuma 1979). Los estrógenos y la progesterona modulan la expresión del RNA mensajero del receptor de proencefalinas en este núcleo (Kow & Pfaff 1998; Romano et al 1989; Sinchak & Micevych 2003), así como la modulación del reflejo de lordosis y posiblemente el control de otras

conductas proceptivas. En este estudio se especula que la acción de los opioides en el HVM podrían igualmente mediar los aspectos placenteros de la cópula en la rata hembra. Esta área recibe importantes aferencias tanto de la Amígdala como de otras áreas cerebrales que responden a los estímulos recibidos durante el apareamiento. Se ha reportado que los estímulos vagino cervicales en hembras ovariectomizadas y tratadas con vehículo producen una mayor respuesta a Fos en diferentes áreas del HVM, que en las hembras tratadas hormonalmente con estradiol y progesterona (Pfaus et al 1996; Tetel et al 1994). La progesterona podría estar actuando, es a través de segundos mensajeros como el óxido nítrico estimulando la producción de $cGMP$ y modulando los sitios de unión a $GABA_A$, y su interacción con otros neurotransmisores y coactivadores para inducir la conducta de estro (Gonzalez-Flores & Etgen 2004). O bien, por otro lado, la reducción en la actividad de Fos en hembras hormonalmente tratadas, podría ser el resultado de la actividad opioidérgica ya que éstos receptores modulan la actividad nerviosa en este núcleo, reduciendo los potenciales excitatorios postsinápticos aparentemente a través de la acción en los receptores opioides μ pre-sinápticos (Devidze et al 2008). Ello permitiría explicar que una infusión de naloxona en este núcleo podría revertir la acción de los estrógenos, haciendo que el núcleo ventromedial del hipotálamo tenga una respuesta similar a la observada en hembras no receptivas. Podría ser probable que la estimulación vagino-cervical en estas hembras no fuere placentera. De hecho se ha reportado que una sobre estimulación vaginal es aversiva y esta respuesta afectivamente negativa es disminuida por la acción de las hormonas ováricas (Berkley et al 1995; Bradshaw et al 1999). Basándose en estos experimentos, sería difícil saber si la cantidad de estimulación vagino cervical es o no reforzante, ya que no se observó una reducción significativa en el número de intromisiones durante la cópula regulada. Hasta ahora no se conoce si la estimulación de los receptores a opioides en el HVM produce una respuesta placentera o induce un condicionamiento de cambio de preferencia. Cabe destacar que existe un importante número de proyecciones ecefalinérgicas del HVM al APM (Hoffman et al 1996), y como ya se mencionó la administración de encefalinas directamente en esta área induce un cambio de preferencia (Agmo & Gomez 1991). Además se ha propuesto que las terminaciones axónicas de estas

proyecciones encefalinérgicas inervan neuronas GABAérgicas (Commons et al 1999). Si la administración de naloxona bloqueara los receptores a opioides de estas neuronas se produciría un incremento de la inhibición de las mismas células, esta inhibición podría ser suficiente para evitar o reducir la información encefalinérgica proveniente del HVM hacia el APM bloqueando así el efecto positivo producido por la conducta sexual. Desde luego que esta aseveración tendría que ser puesta a prueba en futuros experimentos.

Se ha planteado también que la Amígdala parece tener una acción moduladora de la conducta sexual femenina al censar la cantidad de estimulación que la hembra recibe durante el apareamiento (Guarraci et al 2004; Kondo & Sakuma 2005; Masco & Carrer 1980; Polston & Erskine 2001; Romero et al 1990). La Amígdala es un importante relevo de la información sensorial recibida por la estimulación vaginocervical (Coopersmith et al 1996), y el bloqueo de los receptores a opioides en esta área inhibe la liberación de prolactina en respuesta a la conducta sexual (Sirinathsinghji & Audsley 1985; Yang et al 2000). Los péptidos opioides colocalizan con muchos otros neurotransmisores por lo que es extremadamente difícil definir con precisión el mecanismo exacto por el cual los aspectos afectivos positivos de la cópula regulada tienen su efecto, y cuál es el papel de la Amígdala en este aspecto. Es posible que de alguna manera la naloxona disminuya el efecto de los estímulos sensoriales que la hembra requiere durante la cópula regulada para que esta induzca un estado afectivo positivo. Es importante destacar que la AMG medial muestra una respuesta selectiva a FOS de acuerdo a los intervalos de estimulación que recibe, sugiriendo que esta estructura es capaz de procesar la cantidad de estimulación y el período ínter intromisión integrando así la estimulación que la hembra recibe durante el apareamiento (Erskine & Hanrahan 1997).

El núcleo Accumbens se ha asociado al procesamiento de conductas mediadas por opioides endógenos como los son la auto administración de alimentos palatables y los efectos hedónicos de la administración de psicoestimulantes que producen adicción (Ward et al 2006). Se ha reportado también que lesiones bilaterales, en ratas hembras, con ácido quinolinico o iboténico disminuyen las interacciones sexuales con machos expertos (Guarraci et al 2002; Jenkins & Becker 2001). Inclusive, se ha propuesto que

este núcleo es importante para el procesamiento de la cópula regulada modulada por dopamina (Jenkins & Becker 2001; Xiao & Becker 1997). Sin embargo, los resultados de los estudios aquí mencionados son poco claros y en algunos casos son inconsistentes ya que diferentes parámetros parecen modificarse en los diferentes experimentos. Además es difícil concebir que una estructura modifique solamente un parámetro de la cópula dejando intactos a los demás. Mientras que un estudio reportó un incremento en el número de salidas después de una monta (Guarraci et al 2002), otro encontró un incremento en el número de respuestas de rechazo hacia el macho después de un intento de monta (Rivas & Mir 1990), y el tercero encontró, en la mitad de los animales lesionados, un incremento en la latencia para cruzar al compartimiento del macho antes del inicio del apareamiento (Jenkins & Becker 2001). La inconsistencia del efecto de lesiones del ACB pone en duda su participación directa en la conducta sexual regulada por la hembra (Paredes & Agmo 2004). Por otro lado, se ha especulado que el núcleo ACB podría participar en los aspectos apetitivos o motivacionales de la cópula. Sin embargo, no existe evidencia de ello. En nuestros experimentos, no se observó ningún cambio significativo en los parámetros de la conducta sexual como resultado de la infusión de la naloxona en el ACB, lo que concuerda con los hallazgos obtenidos por el grupo de Agmo que propone que este núcleo no tiene una participación específica en la conducta sexual (Paredes & Agmo 2004). Aún cuando este núcleo pudiera estar mediando algunos de los aspectos de la conducta sexual femenina, los resultados de los experimentos realizados en este trabajo proponen que, al menos si así fuere éstos no son mediados por opioides. Esto concuerda con los resultados obtenidos en machos, en los que se reporta que infusiones de naloxona en este núcleo no bloquea el efecto afectivo positivo de la eyaculación (Agmo & Gomez 1993). Los resultados de este estudio muestran que la naloxona, un antagonista opioide, administrado en el APM bloquea el efecto afectivo positivo inducido por la cópula regulada. Esto podría sugerir que la liberación de opioides en el APM como respuesta a los diferentes estímulos que la hembra recibe durante la cópula regulada, es necesaria para inducir un estado placentero en la rata hembra. De igual manera, el bloqueo de los receptores a opioides en la AMG y en el HVM como resultado de la infusión de naloxona, parece interferir con los

impulsos sensoriales, que llegan al APM, y por consiguiente e indirectamente bloquear el condicionamiento de preferencia de lugar. La hipótesis de que el APM es una estructura crucial para el procesamiento de la información sensorial que la hembra recibe durante el apareamiento está sustentada en los datos que muestran que las lesiones en esta área desorganizan la secuencia temporal de la cópula regulada (Yang & Clements 2000).

Es importante señalar por otro lado, que de acuerdo al modelo de motivación hacia un incentivo sexual, una hembra receptiva es atraída por el macho a través de diversas claves sensoriales con propiedades incentivas (Agmo 1999). Las hembras en estro prefieren la cercanía de un macho experto a la de un macho gonadectomizado (Agmo 1999; 2003), y esta preferencia es dependiente de hormonas ya que las hembras ovariectomizadas no muestran esta preferencia (Agmo 2008). Los resultados de los presentes experimentos de motivación hacia un incentivo sexual muestran que la naloxona, no tiene ningún efecto sobre la preferencia de las hembras por un macho experto. Tampoco se encontraron diferencias entre las hembras que recibieron una infusión de NaCl o de naloxona en ninguna de las áreas evaluadas. Esto apoya la hipótesis de que los mecanismos neurales que controlan las conductas de aproximación o motivación hacia un incentivo no parecen ser los mismos a los responsables del efecto afectivo positivos como resultado de la conducta copulatoria (Agmo 2003). La infusión de naloxona en el APM, en el HVM y en la AMG puede bloquear el CPL inducido por la cópula regulada, pero no parece tener ningún efecto sobre la preferencia entre un macho experto y uno gonadectomizado.

De acuerdo a los resultados de los experimentos aquí presentados el APM, el HVM y la AMG son estructuras fundamentales del circuito de reforzamiento de la conducta sexual regulada en la rata hembra (Figura 17). En esta figura se muestran las estructuras que conforman la vía de entrada de la estimulación proveniente del área vagino-cervical, de los flancos así como de la información olfatoria que recibe durante el apareamiento. Se ha postulado, utilizando trazadores virales, que estas estructuras forman parte importante del sustrato neural que se encarga del procesamiento de la información sensorial proveniente de regiones vaginales que la hembra recibe durante la cópula y de la conducta reproductiva (Flanagan-Cato 2000; Marson & Murphy 2006). Como resultado de este trabajo postulamos que el APM el HVM y la AMG son estructuras que podrían ser parte clave del circuito que integra la información durante la cópula y la traduce posteriormente en placentera.

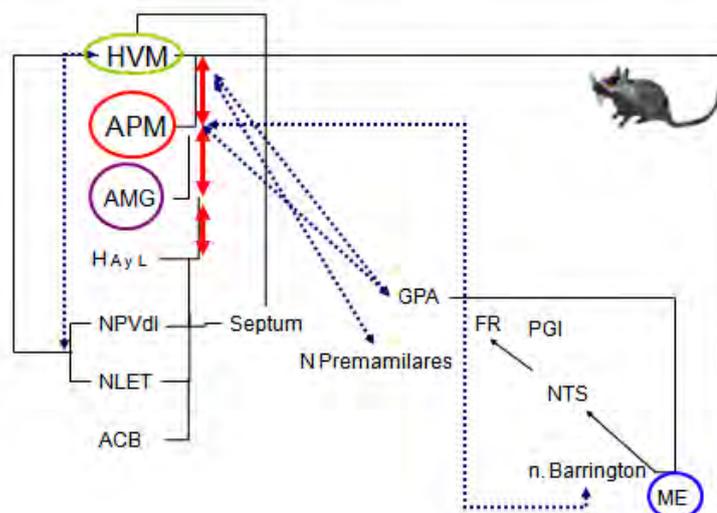


Figura 17. El hipotálamo ventro medial (HVM), el área preóptica medial (APM) y la amígdala (AMG) son estructuras fundamentales del circuito que procesa los estímulos afectivos positivos como resultado de la cópula regulada. Estas estructuras reciben conexiones de otras regiones cerebrales que procesan información sensorial durante la cópula y que influyen en los estados afectivos de la cópula. Como lo son: el hipotálamo anterior y el hipotálamo lateral (H y L), núcleo paraventricular dorsolateral (NPVdl), núcleo lecho de la estría terminal (NLET), accumbens (ACB), sustancia gris periacueductal (GPA), formación reticular (FR), núcleo del tracto solitario (NTS), paragigantocelularis (PGI) y la médula espinal (ME).

Futuros estudios deberán evaluar si otras estructuras cerebrales participan en los estados afectivos positivos inducidos por la copula. También es necesario determinar si algún tipo de receptor a opioide modula específicamente los estados placenteros asociados a la copula. Es claro, que las hormonas ováricas junto con diversos péptidos interactúan para ejercer su acción y modificar el comportamiento sexual femenino. Sin embargo, aún permanece sin respuesta cuales son los mecanismos celulares por lo que esto ocurre. Este trabajo de tesis colabora de manera importante agregando valiosa información al marco teórico que permite entender como el cerebro integra diversas funciones.

Por último, el conocimiento que se obtiene del estudio de la fisiología de la conducta sexual femenina a través del uso de modelos animales proporciona una herramienta invaluable para desarrollar nuevas estrategias que puedan explicar como el cerebro integra los aspectos neuroendocrinos con el comportamiento.

Bibliografía

- Acosta-Martinez M y Etgen AM. 2002a. Activation of mu-opioid receptors inhibits lordosis behavior in estrogen and progesterone-primed female rats. *Horm Behav* 41:88-100
- Acosta-Martinez M y Etgen AM. 2002b. The role of delta-opioid receptors in estrogen facilitation of lordosis behavior. *Behav Brain Res* 136:93-102
- Agmo A. 1999. Sexual motivation--an inquiry into events determining the occurrence of sexual behavior. *Behav Brain Res* 105:129-150
- Agmo A. 2003. Unconditioned sexual incentive motivation in the male Norway rat (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol* 117:3-14
- Agmo A. 2008. On the concept of sexual arousal: a simpler alternative. *Horm Behav* 53:312-314; author reply 319-322
- Agmo A y Berenfeld R. 1990. Reinforcing properties of ejaculation in the male rat: role of opioids and dopamine. *Behav Neurosci* 104:177-182
- Agmo A, Federman I, Navarro V, Padua M y Velazquez G. 1993. Reward and reinforcement produced by drinking water: Role of opioids and dopamine receptor subtypes. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 46:183-194.
- Agmo A y Fernandez H. 1989. Dopamine and sexual behavior in the male rat: a reevaluation. *J Neural Transm* 77:21-37
- Agmo A y Gomez M. 1991. Conditioned place preference produced by infusion of Met-enkephalin into the medial preoptic area. *Brain Res* 550:343-346.
- Agmo A y Gomez M. 1993. Sexual reinforcement is blocked by infusion of naloxone into the medial preoptic area. *Behav Neurosci* 107:812-818.
- Agmo A, Gomez M y Irazabal Y. 1994. Enkephalinase inhibition facilitates sexual behavior in the male rat but does not produce conditioned place preference. *Pharmacol Biochem Behav* 47:771-778
- Agmo A y Paredes R. 1988. Opioids and sexual behavior in the male rat. *Pharmacol Biochem Behav* 30:1021-1034.
- Agmo A y Pfaff DW. 1999. Research on the neurobiology of sexual behavior at the turn of the millennium. *Behav Brain Res* 105:1-4
- Anisko JJ, Suer SF, McClintock MK y Adler NT. 1978. Relation between 22-kHz ultrasonic signals and sociosexual behavior in rats. *J Comp Physiol Psychol* 92:821-829
- Beach FA. 1956. Characteristics of masculine "sex drive". In *Nebraska Symposium on Motivation*, ed. RM Jones, pp. 1-32: University of Nebraska Press, Lincoln
- Beach FA. 1976. Sexual attractivity, proceptivity, and receptivity in female mammals. *Horm Behav* 7:105-138
- Becker JB, Rudick CN y Jenkins WJ. 2001. The role of dopamine in the nucleus accumbens and striatum during sexual behavior in the female rat. *J Neurosci* 21:3236-3241
- Berkley KJ, Wood E, Scofield SL y Little M. 1995. Behavioral responses to uterine or vaginal distension in the rat. *Pain* 61:121-131
- Bermant G. 1961. Response latencies of female rats during sexual intercourse. *Science* 133:1771-1773
- Bermant G y Westbrook WH. 1966. Peripheral factors in the regulation of sexual contact by female rats. *J Comp Physiol Psychol* 61:244-250
- Blaustein JD y Erskine MS. 2002. *Feminine sexual behavior: Cellular integration of hormonal and afferent information in the rodent brain*. New York: Academic Press. 139-214 pp.
- Blaustein JDaMSK. 2007. Femenine Sexual Behavior from Neuroendocrine and Molecular Neurobiological Perspectives. In *Behavioral Neurochemistry and Neuroendocrinology.*, ed. A Lajtha, pp. 3-37. Berlin: Springer-Verlag

- Bradshaw HB, Temple JL, Wood E y Berkley KJ. 1999. Estrous variations in behavioral responses to vaginal and uterine distention in the rat. *Pain* 82:187-197
- Brandling-Bennett EM, Blasberg ME y Clark AS. 1999. Paced mating behavior in female rats in response to different hormone priming regimens. *Horm Behav* 35:144-154
- Brown DR y Goldberg LI. 1985. The use of quaternary narcotic antagonists in opiate research. *Neuropharmacology* 24:181-191
- Camacho F, Sandoval C y Paredes RG. 2004. Sexual experience and conditioned place preference in male rats. *Pharmacol Biochem Behav* 78:419-425
- Commons KG, Kow LM, Milner TA y Pfaff DW. 1999. In the ventromedial nucleus of the rat hypothalamus, GABA-immunolabeled neurons are abundant and are innervated by both enkephalin- and GABA-immunolabeled axon terminals. *Brain Res* 816:58-67
- Coopersmith C, Candurra C y Erskine MS. 1996. Effects of paced mating and intromissive stimulation on feminine sexual behavior and estrus termination in the cycling rat. *J Comp Psychol* 110:176-186
- Coria-Avila GA, Pfaus JG, Miquel M, Pacheco P y Manzo J. 2008. [Conditioned preferences induced by sex and drugs: a comparison of the neural bases]. *Rev Neurol* 46:213-218
- Delville Y. 1991. Progesterone-facilitated sexual receptivity: a review of arguments supporting a nongenomic mechanism. *Neurosci Biobehav Rev* 15:407-414
- Deswurry DA, Goodman, E. D., Sallis, P. J. & Bunnell, B. N. 1968. Effects of hippocampal lesions on the copulatory behavior of the male rats. *Physiol Behav.* 25:29-55
- Devidze N, Zhang Q, Zhou J, Lee AW, Pataky S, et al. 2008. Presynaptic actions of opioid receptor agonists in ventromedial hypothalamic neurons in estrogen- and oil-treated female mice. *Neuroscience* 152:942-949
- Emery DE y Moss RL. 1984. Lesions confined to the ventromedial hypothalamus decrease the frequency of coital contacts in female rats. *Horm Behav* 18:313-329
- Erskine MS. 1989. Solicitation behavior in the estrous female rat: a review. *Horm Behav* 23:473-502
- Erskine MS. 1992. Pelvic and pudendal nerves influence the display of paced mating behavior in response to estrogen and progesterone in the female rat. *Behav Neurosci* 106:690-697
- Erskine MS. 1993. Mating-induced increases in FOS protein in preoptic area and medial amygdala of cycling female rats. *Brain Res Bull* 32:447-451
- Erskine MS y Hanrahan SB. 1997. Effects of paced mating on c-fos gene expression in the female rat brain. *J Neuroendocrinol* 9:903-912
- Erskine MS, Kornberg E y Cherry JA. 1989. Paced copulation in rats: effects of intromission frequency and duration on luteal activation and estrus length. *Physiol Behav* 45:33-39
- Erskine MS, Lehmann ML, Cameron NM y Polston EK. 2004. Co-regulation of female sexual behavior and pregnancy induction: an exploratory synthesis. *Behav Brain Res* 153:295-315
- Fadem BH, Barfield RJ y Whalen RE. 1979. Dose-response and time-response relationships between progesterone and the display of patterns of receptive and proceptive behavior in the female rat. *Horm Behav* 13:40-48
- Flanagan-Cato LM. 2000. Estrogen-induced remodeling of hypothalamic neural circuitry. *Front Neuroendocrinol* 21:309-329
- Fletcher PJ, Ming ZH y Higgins GA. 1993. Conditioned place preference induced by microinjection of 8-OH-DPAT into the dorsal or median raphe nucleus. *Psychopharmacology (Berl)* 113:31-36
- Frye CA, Walf AA y Petralia SM. 2006. In the ventral tegmental area, progestins have actions at D1 receptors for lordosis of hamsters and rats that involve GABA A receptors. *Horm Behav* 50:332-337

- Garcia Horsman P y Paredes RG. 2004. Dopamine antagonists do not block conditioned place preference induced by paced mating behavior in female rats. *Behav Neurosci* 118:356-364
- Gilman DP y Westbrook WH. 1978. Mating preference and sexual reinforcement in female rats. *Physiol Behav* 20:11-14
- Gonzalez-Flores O, Camacho FJ, Dominguez-Salazar E, Ramirez-Orduna JM, Beyer C y Paredes RG. 2004. Progestins and place preference conditioning after paced mating. *Horm Behav* 46:151-157
- Gonzalez-Flores O y Etgen AM. 2004. The nitric oxide pathway participates in estrous behavior induced by progesterone and some of its ring A-reduced metabolites. *Horm Behav* 45:50-57
- Guarraci FA y Clark AS. 2003. Amphetamine modulation of paced mating behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 76:505-515
- Guarraci FA, Megroz AB y Clark AS. 2002. Effects of ibotenic acid lesions of the nucleus accumbens on paced mating behavior in the female rat. *Behav Neurosci* 116:568-576
- Guarraci FA, Megroz AB y Clark AS. 2004. Paced mating behavior in the female rat following lesions of three regions responsive to vaginocervical stimulation. *Brain Res* 999:40-52
- Hardy DF y DeBold JF. 1972. Effects of coital stimulation upon behavior of the female rat. *J Comp Physiol Psychol* 78:400-408
- Hardy DF y DeBold JF. 1973. Effects of repeated testing on sexual behavior of the female rat. *J Comp Physiol Psychol* 85:195-202
- Hasenohrl RU, Oitzl MS y Huston JP. 1989. Conditioned place preference in the corral: a procedure for measuring reinforcing properties of drugs. *J Neurosci Methods* 30:141-146
- Hill TE y Thomas TR. 1973. The role of reinforcement in the sexual behavior of the female rat. *Physiol Behav* 11:911-913
- Hoffman GE, Dohanics J, Watson RE, Jr. y Wiegand SJ. 1996. The hypothalamic ventromedial nucleus sends a met-enkephalin projection to the preoptic area's periventricular zone in the female rat. *Brain Res Mol Brain Res* 36:201-210
- Hoshina Y, Takeo T, Nakano K, Sato T y Sakuma Y. 1994. Axon-sparing lesion of the preoptic area enhances receptivity and diminishes proceptivity among components of female rat sexual behavior. *Behav Brain Res* 61:197-204
- Hosokawa N y Chiba A. 2007. Effects of sexual experience on conspecific odor preference and male odor-induced activation of the vomeronasal projection pathway and the nucleus accumbens in female rats. *Brain Res* 1175:66-75
- Hull EM, Lorrain DS, Du J, Matuszewich L, Lumley LA, et al. 1999. Hormone-neurotransmitter interactions in the control of sexual behavior. *Behav Brain Res* 105:105-116
- Jenkins WJ y Becker JB. 2001. Role of the striatum and nucleus accumbens in paced copulatory behavior in the female rat. *Behav Brain Res* 121:119-128
- Kato A y Sakuma Y. 2000. Neuronal activity in female rat preoptic area associated with sexually motivated behavior. *Brain Res* 862:90-102
- Knobil EN, J. D. 1994. New York: Reven Press, Ltd.
- Knobil Ey y Neill JD. 1994a. *The Physiology of Reproduction. Sex Determination and Differentiation.* George, F W y Wilson, J D. New York: Raven Press, Ltd.
- Knobil Ey y Neill JD. 1994b. *The physiology of Reproduction. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat.* Freeman, M. E.: Reven Press, Ltd.
- Komisaruk BR. 1974. Neural and hormonal interactions in the reproductive behavior of female rats. *Adv Behav Biol* 11:97-129
- Kondo Y y Sakuma Y. 2005. The medial amygdala controls the coital access of female rats: a possible involvement of emotional responsiveness. *Jpn J Physiol* 55:345-353

- Kow LM y Pfaff DW. 1998. Mapping of neural and signal transduction pathways for lordosis in the search for estrogen actions on the central nervous system. *Behav Brain Res* 92:169-180
- Kudwa AE, Dominguez-Salazar E, Cabrera DM, Sibley DR y Rissman EF. 2005. Dopamine D5 receptor modulates male and female sexual behavior in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 180:206-214
- Mani S. 2001. Ligand-independent activation of progesterin receptors in sexual receptivity. *Horm Behav* 40:183-190
- Mani S. 2008. Progesterin receptor subtypes in the brain: the known and the unknown. *Endocrinology* 149:2750-2756
- Mani SK, Allen JM, Clark JH, Blaustein JD y O'Malley BW. 1994. Convergent pathways for steroid hormone- and neurotransmitter-induced rat sexual behavior. *Science* 265:1246-1249
- Mani SK, Fienberg AA, O'Callaghan JP, Snyder GL, Allen PB, et al. 2000. Requirement for DARPP-32 in progesterone-facilitated sexual receptivity in female rats and mice. *Science* 287:1053-1056
- Mani SK, Reyna AM, Chen JZ, Mulac-Jericevic B y Conneely OM. 2006. Differential response of progesterone receptor isoforms in hormone-dependent and -independent facilitation of female sexual receptivity. *Mol Endocrinol* 20:1322-1332
- Mansour A, Fox CA, Akil H y Watson SJ. 1995a. Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci* 18:22-29
- Mansour A, Fox CA, Burke S, Akil H y Watson SJ. 1995b. Immunohistochemical localization of the cloned mu opioid receptor in the rat CNS. *J Chem Neuroanat* 8:283-305
- Manzanedo C, Aguilar MA, Rodriguez-Arias M y Minarro J. 2001. Effects of dopamine antagonists with different receptor blockade profiles on morphine-induced place preference in male mice. *Behav Brain Res* 121:189-197
- Marson L y Murphy AZ. 2006. Identification of neural circuits involved in female genital responses in the rat: a dual virus and anterograde tracing study. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291:R419-428
- Martinez I y Paredes RG. 2001. Only self-paced mating is rewarding in rats of both sexes. *Horm Behav* 40:510-517
- Masco DH y Carrer HF. 1980. Sexual receptivity in female rats after lesion or stimulation in different amygdaloid nuclei. *Physiol Behav* 24:1073-1080
- McCarthy MM, Kleopoulos SP, Mobbs CV y Pfaff DW. 1994. Infusion of antisense oligodeoxynucleotides to the oxytocin receptor in the ventromedial hypothalamus reduces estrogen-induced sexual receptivity and oxytocin receptor binding in the female rat. *Neuroendocrinology* 59:432-440
- McClintock MK y Adler NT. 1978. The role of the female during copulation in wild and domestic Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Behaviour* 67:67-96
- McClintock MK y Anisko JJ. 1982. Group mating among Norway rats. I. Sex differences in the pattern and neuroendocrine consequences of copulation. *Anim. Behav* 30:398-409
- McClintock MK, Anisko JJ y Adler NT. 1982. Group mating among Norway rats. II. The social dynamics of copulation: competition, cooperation, and mate choice. *Anim. Behav* 30:410-425
- Mehrara BJ y Baum MJ. 1990. Naloxone disrupts the expression but not the acquisition by male rats of a conditioned place preference response for an oestrous female. *Psychopharmacology (Berl)* 101:118-125
- Meisel RL y Joppa MA. 1994. Conditioned place preference in female hamsters following aggressive or sexual encounters. *Physiol Behav* 56:1115-1118
- Menard CS y Dohanich GP. 1994. Estrogen dependence of cholinergic systems that regulate lordosis in cycling female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 48:417-421

- Mermelstein PG y Becker JB. 1995. Increased extracellular dopamine in the nucleus accumbens and striatum of the female rat during paced copulatory behavior. *Behav Neurosci* 109:354-365
- Miller RL y Baum MJ. 1987. Naloxone inhibits mating and conditioned place preference for an estrous female in male rats soon after castration. *Pharmacol Biochem Behav* 26:781-789
- Morali G y Beyer C. 1979. *Endocrine control of Sexual Behavior*. New York: C. Beyer, Raven Press
- Paredes RG. 2003. Medial preoptic area/anterior hypothalamus and sexual motivation. *Scand J Psychol* 44:203-212
- Paredes RG y Agmo A. 2004. Has dopamine a physiological role in the control of sexual behavior? A critical review of the evidence. *Prog Neurobiol* 73:179-226
- Paredes RG y Alonso A. 1997. Sexual behavior regulated (paced) by the female induces conditioned place preference. *Behav Neurosci* 111:123-128
- Paredes RG, Contreras JL y Agmo A. 2000. Serotonin and sexual behavior in the male rabbit. *J Neural Transm* 107:767-777
- Paredes RG y Martinez I. 2001. Naloxone blocks place preference conditioning after paced mating in female rats. *Behav Neurosci* 115:1363-1367
- Paredes RG y Vazquez B. 1999. What do female rats like about sex? Paced mating. *Behav Brain Res* 105:117-127
- Paxinos G y Watson CH. 2005. The rat brain in stereotaxic coordinates. In *Academic Press, New York*
- Peirce JT y Nuttall RL. 1961a. Duration of sexual contacts in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 54:585-587
- Peirce JT y Nuttall RL. 1961b. Self-paced sexual behavior in the female rat. *J Comp Physiol Psychol* 54:310-313
- Pfaff D, Frohlich J y Morgan M. 2002. Hormonal and genetic influences on arousal--sexual and otherwise. *Trends Neurosci* 25:45-50
- Pfaff DW. 1980. *Estrogens and brain function: neural analysis of a hormone-controlled mammalian reproductive behavior*. New York: Springer
- Pfaff DW. 1999. *Drive. Neurobiological and molecular mechanisms of sexual motivation*. Cambridge, MA.: MIT Press,
- Pfaff DW y Sakuma Y. 1979. Facilitation of the lordosis reflex of female rats from the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Physiol* 288:189-202
- Pfaff DW, Schwartz-Giblin S, McCarthy MM y Kow L. 1994. Cellular and molecular mechanisms of female reproductive behavior In *The Physiology of Reproduction*, ed. E Knobil, JD Neil, pp. 107-220. New York: Raven Press
- Pfaus JG. 1999a. Neurobiology of sexual behavior. *Curr Opin Neurobiol* 9:751-758
- Pfaus JG. 1999b. Revisiting the concept of sexual motivation. *Annu Rev Sex Res* 10:120-156
- Pfaus JG, Damsma G, Wenkstern D y Fibiger HC. 1995. Sexual activity increases dopamine transmission in the nucleus accumbens and striatum of female rats. *Brain Res* 693:21-30
- Pfaus JG, Kippin TE y Centeno S. 2001. Conditioning and sexual behavior: a review. *Horm Behav* 40:291-321
- Pfaus JG, Marcangione C, Smith WJ, Manitt C y Abillamaa H. 1996. Differential induction of Fos in the female rat brain following different amounts of vaginocervical stimulation: modulation by steroid hormones. *Brain Res* 741:314-330
- Pfaus JG, Smith WJ, Byrne N y Stephens G. 2000. Appetitive and consummatory sexual behaviors of female rats in bilevel chambers. II. Patterns of estrus termination following vaginocervical stimulation. *Horm Behav* 37:96-107

- Pfaus JG, Smith WJ y Coopersmith CB. 1999. Appetitive and consummatory sexual behaviors of female rats in bilevel chambers. I. A correlational and factor analysis and the effects of ovarian hormones. *Horm Behav* 35:224-240
- Polston EK y Erskine MS. 1995. Patterns of induction of the immediate-early genes c-fos and egr-1 in the female rat brain following differential amounts of mating stimulation. *Neuroendocrinology* 62:370-384
- Polston EK y Erskine MS. 2001. Excitotoxic lesions of the medial amygdala differentially disrupt prolactin secretory responses in cycling and mated female rats. *J Neuroendocrinol* 13:13-21
- Richmond G y Clemens L. 1988. Ventromedial hypothalamic lesions and cholinergic control of female sexual behavior. *Physiol Behav* 42:179-182
- Rivas FJ y Mir D. 1990. Effects of nucleus accumbens lesion on female rat sexual receptivity and proceptivity in a partner preference paradigm. *Behav Brain Res* 41:239-249
- Romano GJ, Mobbs CV, Howells RD y Pfaff DW. 1989. Estrogen regulation of proenkephalin gene expression in the ventromedial hypothalamus of the rat: temporal qualities and synergism with progesterone. *Brain Res Mol Brain Res* 5:51-58
- Romero PR, Beltramino CA y Carrer HF. 1990. Participation of the olfactory system in the control of approach behavior of the female rat to the male. *Physiol Behav* 47:685-690
- Rowe DW y Erskine MS. 1993. c-Fos proto-oncogene activity induced by mating in the preoptic area, hypothalamus and amygdala in the female rat: role of afferent input via the pelvic nerve. *Brain Res* 621:25-34
- Sakuma Y. 1994. Estrogen-induced changes in the neural impulse flow from the female rat preoptic region. *Horm Behav* 28:438-444
- Sakuma Y. 1995. Differential control of proceptive and receptive components of female rat sexual behavior by the preoptic area. *Jpn J Physiol* 45:211-228
- Schumacher M, Coirini H, Robert F, Guennoun R y El-Etr M. 1999. Genomic and membrane actions of progesterone: implications for reproductive physiology and behavior. *Behav Brain Res* 105:37-52
- Sinchak K y Micevych P. 2003. Visualizing activation of opioid circuits by internalization of G protein-coupled receptors. *Mol Neurobiol* 27:197-222
- Sirinathsinghji DJ y Audsley AR. 1985. Endogenous opioid peptides participate in the modulation of prolactin release in response to cervicovaginal stimulation in the female rat. *Endocrinology* 117:549-556
- Tetel MJ, Getzinger MJ y Blaustein JD. 1994. Estradiol and progesterone influence the response of ventromedial hypothalamic neurons to tactile stimuli associated with female reproduction. *Brain Res* 646:267-272
- Ward HG, Nicklous DM, Aloyo VJ y Simansky KJ. 2006. Mu-opioid receptor cellular function in the nucleus accumbens is essential for hedonically driven eating. *Eur J Neurosci* 23:1605-1613
- Whalen RE. 1974. Estrogen-progesterone induction of mating in female rats. *Horm Behav* 5:157-162
- Xiao K, Kondo Y y Sakuma Y. 2005. Differential regulation of female rat olfactory preference and copulatory pacing by the lateral septum and medial preoptic area. *Neuroendocrinology* 81:56-62
- Xiao L y Becker JB. 1997. Hormonal activation of the striatum and the nucleus accumbens modulates paced mating behavior in the female rat. *Horm Behav* 32:114-124
- Yang LY y Clements LG. 2000. MPOA lesions affect female pacing of copulation in rats. *Behav Neurosci* 114:1191-1202
- Yang SP, Lee Y y Voogt JL. 2000. Involvement of endogenous opioidergic neurons in modulation of prolactin secretion in response to mating in the female rat. *Neuroendocrinology* 72:20-28

Yang SP y Voogt JL. 2001. Mating-activated brainstem catecholaminergic neurons in the female rat. *Brain Res* 894:159-166