



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE TESTOSTERONA O ESTRADIOL SOBRE
LA CONDUCTA DE CÓPULA EN RATAS MACHO COPULADORES LENTOS Y NO
COPULADORES

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
M. en C. EDWARDS ANTONIO CABRERA

DIRECTOR DE TESIS
DR. RAÚL GERARDO PAREDES GUERRERO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

COMITÉ TUTOR
DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
DR. JOSÉ ALONSO FERNANDEZ GUSTI
DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA,
CINVESTAV

MÉXICO, DF. SEPTIEMBRE DE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado
Becario número: 176600

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas
Matricula: 509018221

A los Dres. Mauricio Díaz Muñoz, José Alonso Fernández Guasti y Raúl Gerardo Paredes
Guerrero por su apoyo en la dirección de la presente tesis

A Francisco Javier Camacho Barrios, Javier Valles, Soledad Medina, Teresita de Jesús
Pérez, Leonor Casanova, Omar Gonzáles, Ramón Martínez, María de Lourdes Lara y
Martin García por su asistencia técnica excelente

DEDICATORIA

A mi esposa Dulce María

A mis hermanos Miguel Angel, María Fernanda, Yuridia, Darwin, Shaila, Alexander,
Axeel, Vladimir y Johan

A mi mamá Artemia Cabrera Giron

CONTENIDO

ABSTRACT	1
RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. CONDUCTA SEXUAL	4
1.1.1. Conducta sexual de la rata macho.....	4
1.2. HORMONAS ESTEROIDES: TESTOSTERONA Y ESTRADIOL.....	6
1.3. ENZIMA ESTEROIDOGÉNICA: P450 AROMATASA	8
1.4. RECEPTORES DE HORMONAS ESTEROIDES: RECEPTOR DE ANDRÓGENOS Y RECEPTOR DE ESTRÓGENOS	10
1.4.1. El receptor de andrógenos.....	11
1.4.2. El receptor de estrógenos	13
1.5. REGULACIÓN HORMONAL DE LA CONDUCTA SEXUAL MASCULINA	14
1.5.1. Mecanismo de acción de la T y del E ₂ sobre la modulación de la conducta sexual masculina	17
1.6. REGULACIÓN NEURAL DE LA CONDUCTA SEXUAL MASCULINA	18
1.6.1. Sistema olfatorio.....	18
1.6.2. Área preóptica medial	21
1.6.3. Núcleo Ventromedial del Hipotálamo	22
1.6.4. Amígdala medial	23
1.6.5. Núcleo lecho de la estría terminal.....	24
1.7. MACHOS COPULADORES LENTOS (CL).....	25
1.8. MACHOS NO COPULADORES (NC).....	26
2. JUSTIFICACIÓN	29

3. HIPÓTESIS	30
4. OBJETIVOS.....	31
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
5.1. GENERALES.....	32
5.1.1. Sujetos	32
5.1.2. Pruebas de cópula	32
5.2. EXPERIMENTO 1: RATAS MACHO CL.....	32
5.2.1. Pruebas de selección	32
5.2.2. Tratamiento hormonal	33
5.2.3. Pruebas de conducta sexual post-implante hormonal	33
5.2.4. Análisis estadístico	33
5.2.5. Resultados.....	34
5.2.5.1. Efecto de la T o E ₂ sobre la conducta de cópula de las ratas macho CL.....	34
5.2.5.2. Efecto de la T o el E ₂ sobre los parámetros copulatorios de las ratas macho CL	36
5.2.5.3. Efecto de la T o E ₂ sobre la masa corporal y de los órganos sexuales accesorios de las ratas macho CL	38
5.2.6. Discusión	39
5.3. EXPERIMENTO 2. RATAS MACHO NC.....	42
5.3.1. Pruebas de selección	42
5.3.2. Cirugía y tratamiento hormonal.....	42
5.3.3. Diseño experimental.....	44
5.3.4. Pruebas de conducta sexual post-implante hormonal	44
5.3.5. Análisis estadístico	44
5.4.6. Resultados.....	45
5.4.6.1. Efecto del implante intracerebral de T o E ₂ a ratas macho C castrados o NC... ..	45
5.4.6.2. Efecto del implante de T o E ₂ en el APM de ratas macho C	47
5.4.6.3. Efecto del implante de T o E ₂ en el NVMH de ratas macho C	49
5.4.6.4. Efecto del implante de T o E ₂ en la AMGm de ratas macho C.....	51

5.4.6.5. Efecto del implante de T o E ₂ fuera del APM o del NVMH o de la AMGm de ratas macho C castrados	53
5.4.6.6. Efecto del implante de T o E ₂ en el APM de ratas macho NC.....	55
5.4.7. Discusión	59
5.4.7.1. Ratas macho copuladores.....	59
5.4.7.2. Ratas macho no copuladores.....	61
6. CONCLUSIONES GENERALES	66
7. PERSPECTIVAS	68
8. REFERENCIAS	69
9. APENDICE.....	86

ABSTRACT

There are some male rats that do not mate despite of the fact that they are repeatedly tested with sexually receptive females. The copulatory deficit in these non-copulating (NC) males is not explained by alterations in plasmatic testosterone (T) or estradiol (E₂) levels. We have observed that in the medial preoptic area (MPA) of NC male rats the aromatase activity and the number of estrogen receptor α (ER α) immunoreactive (ir) cells are reduced and the number of androgen receptors (AR) is higher in NC than in copulating (C) male rats. There are also some male rats that take a long time to ejaculate or they do not ejaculate when tested with receptive females in tests of 30 min or longer. These males are classified as sexually sluggish (SS). The first aim of the present study was to determine whether the subcutaneous (sc) T or E₂ implant in SS male rats could induce the complete mating pattern including ejaculation. Starting one week after SS males were sc implanted with a silastic capsule containing T or E₂ they were weekly tested for 7 weeks with sexually receptive females. The results showed that the sc T implant did not modify the percentage of males that ejaculated. The sc E₂ implant decreased the percentage of SS male rats that ejaculated. These results suggest that the lack of ejaculation in SS male rats is not due to androgenic or estrogenic alterations. The second aim of the study was to evaluate the effectiveness of T or E₂ implants in the MPA or ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMNH) or medial amygdala (MeA) to induce sexual behavior in castrated C male rats. Castrated C male rats were bilaterally implanted in the MPA or the NVMH or the MeA with either T or E₂. One week later all male rats were mated once weekly for five months. The results showed that T implant was more effective than E₂ to induce sexual behavior in the MPA than in the NVMH or in the MeA. These results confirm previous observations indicating that in the male rat the copulatory behavior depends on the hormonal activation of the MPA. Thus, the third aim of the study was to determine if T or E₂ implants in the MPA of NC male rats could induce sexual behavior. Starting one week after the implant, all male rats were mated once weekly for five months. Both, T or E₂ implant in the MPA of NC male rats increased the percentage of males that mounted and intromitted. Four months after T or E₂ implant in the MPA all NC males ejaculated. These results suggest that in the MPA of NC male rats there is a hormonal alteration associated with the lack of sexual behavior. Together, these results suggest that biologic factors associated with the lack of sexual behavior in the NC and SS male rats are different.

RESUMEN

Existen algunas ratas macho que no copulan a pesar de ser probados repetidamente con hembras sexualmente receptivas. La deficiencia copulatoria en estos machos no copuladores (NC) no se explica por alteraciones en la concentración plasmática de testosterona (T) o estradiol (E_2). En cambio, hemos observado que en el área preóptica medial (APM) de las ratas macho NC existe una menor actividad de la enzima aromatasas, un número menor de células inmunorreactivas (ir) al receptor de estrógenos α ($RE\alpha$) y un número mayor de células ir al receptor de andrógenos (RA) que en los machos copuladores (C). También, existen algunas ratas macho que toman más tiempo para eyacular o no eyaculan (CL) cuando son probados con hembras receptivas en pruebas de 30 min o más. El primer objetivo fue determinar si el implante subcutáneo (sc) de T o E_2 a ratas macho CL puede inducir la eyaculación. Los machos CL recibieron implantes sc de T o E_2 y una semana más tarde fueron sometidos a 7 pruebas, una por semana, de cópula con hembras sexualmente receptivas. Los resultados muestran que en los macho CL, el implante sc de T no modificó el porcentaje de machos que eyaculan. En cambio, el implante sc de E_2 disminuyó el porcentaje de machos que eyaculan. Estos resultados sugieren que la falta de eyaculación, en los machos CL, no se debe a una alteración androgénica o estrogénica. El segundo objetivo fue evaluar la efectividad del implante de T o E_2 en el APM, en el núcleo ventromedial del hipotálamo (NVMH) o en la amígdala medial (AMGm) de ratas macho C castrados en la restauración de la conducta copulatoria. Se implantaron en una de estas áreas cerebrales cánulas guía con T o E_2 o vacías. Una semana después del implante, los machos fueron sometidos a una prueba de cópula por semana durante cinco meses. Los resultados mostraron, que en las ratas macho C castrados, el implante intracerebral de T fue más eficaz que el de E_2 en inducir la cópula. Aun más, en el APM de las ratas macho C castrados, el implante de T fue más eficaz en inducir la cópula que en el NVMH o en la AMGm. Estos resultados sugieren, que en las ratas macho, la expresión de la cópula depende de la activación hormonal del APM. Por lo tanto, el tercer objetivo fue determinar si el implante de T o E_2 en el APM de los machos NC es capaz de inducir la cópula. En el APM de los machos NC se implantó una cánula guía con T o E_2 o vacía. Una semana más tarde, los machos fueron sometidos a pruebas semanales de cópula por cinco meses. Observamos que en el APM de estos machos, el implante de T o E_2 estimuló la cópula de forma gradual. Es decir, una semana después del implante de T o E_2 en el

APM de los machos NC, el porcentaje de machos que montan e intromiten se incrementó. Cuatro meses después del implante de T o E₂ todos los machos NC eyacularon. Estos resultados sugieren, que en el APM de los machos NC, existe una alteración hormonal asociada a la falta de cópula. En su conjunto, estos hallazgos sugieren que la falta de eyaculación (machos CL) o la falta de cópula (machos NC) están asociados a factores biológicos distintos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CONDUCTA SEXUAL

La conducta sexual es una interacción social que se presenta en muchas especies del reino animal (Larsson, 1956). En roedores y en muchas otras especies de mamíferos, esta conducta es innata y genéticamente determinada. Para cada especie, la expresión de esta conducta asegura su preservación. Pero, para el individuo no tiene otra finalidad o propósito más que su propia ejecución (Agmo, 1997; 1999). De hecho, Anders Agmo (2007) define la conducta sexual como “cualquier acción que lleve a la recompensa sexual. La recompensa sexual es un estado afectivo positivo activado por la estimulación física de los genitales o la representación mental de dicha estimulación”.

Los estudiosos de la conducta sexual han convenido distinguir dos componentes de la conducta sexual: el motivacional (o apetitivo) y el de ejecución (o consumatorio). El motivacional comprende aquellas conductas que tienen como propósito la búsqueda y atracción de la pareja sexual. En otros términos, el componente motivacional de la conducta sexual refleja el interés del individuo para iniciar la cópula. Mientras que el componente de ejecución hace referencia a la cópula misma y a los patrones conductuales que la caracterizan (Hull et al., 2006).

1.1.1. Conducta sexual de la rata macho

En la rata macho y en otras especies de mamífero, el componente motivacional de la conducta sexual se caracteriza por conductas de exploración, marcaje del territorio con orina, persecución y olfateo de la vulva de la hembra (Dewsbury, 1967; 1979). Por su parte, la hembra receptiva responde a la conducta masculina desplegando conductas proceptivas como el brincoteo, el desplazamiento en zig-zag y movimientos vibratorios de la cabeza y las orejas (Dewsbury, 1979). Durante este período tanto el macho como la hembra emiten vocalizaciones ultrasónicas de 50 kHz con el objetivo de aumentar su motivación sexual (Hull et al., 2006). El componente de ejecución de la conducta sexual en la rata macho se caracteriza por una secuencia de respuestas

sexuales que incluyen patrones motores de montas e intromisiones repetidas e intercaladas que culminan en el patrón motor de eyaculación, a la cual le sigue un período refractario a la estimulación sexual denominado intervalo post-eyaculatorio (Hull et al., 2006).

En la rata macho, la monta es un patrón motor definido como la aproximación del macho por la parte posterior de la hembra. En seguida, el macho palpa los flancos de la hembra con sus patas delanteras y ejerce movimientos pélvicos, pero sin inserción peneana. Luego, el macho se desmonta de la hembra de forma lenta. El patrón motor de intromisión se presenta como una monta simple y breve que termina con un movimiento pélvico profundo. Esto último, indica que ha habido una inserción peneana. En este caso, el macho se desmonta rápido y de forma violenta. El patrón motor de eyaculación incluye una intromisión, caracterizada por un movimiento pélvico profundo que es mantenido por varios segundos y que técnicamente se refiere a la emisión espasmódica o continua de líquido seminal a través del meatus urinario del pene hacia el exterior. El acto de desmonta es lento y también se caracteriza por un movimiento lateral de las patas delanteras (Agmo, 1997; Dewsbury, 1967; Hull et al., 2006; Larsson, 1979). Después de la eyaculación se observa un intervalo post-eyaculatorio el cual se define como un período de refractariedad a la estimulación sexual. En la rata macho, este período dura entre 5-7 min después de la primera eyaculación y se prolonga exponencialmente en las siguientes eyaculaciones (Larsson, 1979). Durante el intervalo post-eyaculatorio se observan dos fases: la fase refractaria absoluta y la fase refractaria relativa. En la fase refractaria absoluta el macho emite vocalizaciones de 22 kHz y se muestra insensible a la estimulación externa para ejercer la cópula y ocupa el primer 75% de la duración total de este intervalo (Barfield y Geyer, 1972). Durante la fase refractaria relativa el macho es capaz de iniciar la cópula si se le estimula suficientemente, por ejemplo cambiando a la hembra o aplicándole a la piel choques eléctricos de baja intensidad (Barfield y Sachs, 1968). Una vez transcurrido el período refractario el animal puede reiniciar la cópula.

1.2. HORMONAS ESTEROIDES: TESTOSTERONA Y ESTRADIOL

Las hormonas esteroideas son mensajeros químicos que derivan del colesterol. Estos compuestos se caracterizan por poseer una estructura de anillos fusionados conocido como ciclopentanoperhidrofenantreno o esterano (de ahí el nombre de esteroideas, que quiere decir: semeja al o que deriva del esterano). Existen seis familias de hormonas esteroideas que son clasificados con base en su estructura y función biológica: la vitamina D y sus derivados, los glucocorticoides, los mineralocorticoides, los progestágenos, los andrógenos y los estrógenos (Norman y Litwack, 1997). La testosterona (T) y el estradiol (E₂) (figura 1) son hormonas esteroideas androgénicas y estrogénicas, respectivamente, responsables del desarrollo y mantenimiento de las características anatómicas, funcionales y conductuales de muchas especies de mamíferos (Kamat et al., 2002).

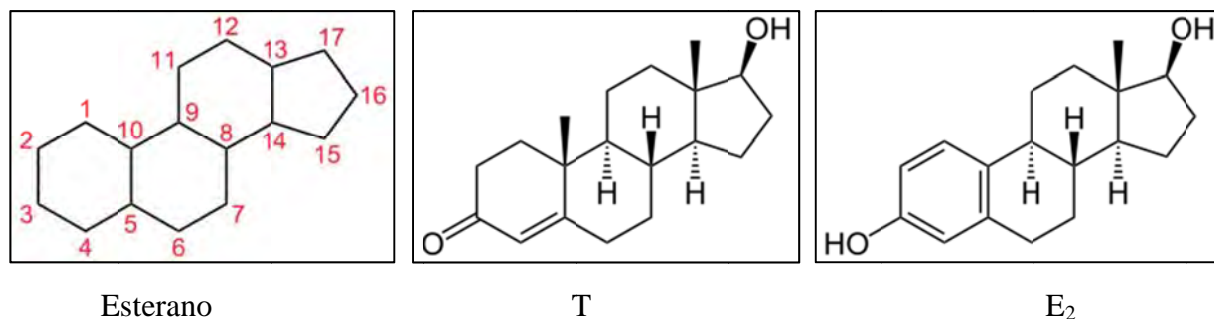


Figura 1. Estructuras químicas del esterano, la T y del E₂. Note que la T y el E₂ comparten un sistema de anillos fusionados básico semejante al esterano. Sobre la estructura química del esterano se muestra la numeración de los carbonos (Tomado y modificado de Norman y Litwack, 1997).

En los mamíferos macho, la síntesis de T se lleva a cabo principalmente en las células de Leydig de los testículos. En la hembra, se ha observado que la hormona luteinizante (HL) estimula al cuerpo lúteo y la hormona estimulante de los folículos (HEF) a las células de la teca del ovario para producir T (Snyder, 2001). También, la zona fasciculata adrenal de la hembra produce un 25% de la T circulante (Burger, 2002). En las hembras, la fuente principal de E₂ son las células granulosas de los ovarios (Snyder, 2001). En machos, los testículos y el cerebro también pueden producir cantidades fisiológicamente significativas de E₂ (García-Segura, 2008; Norman y Litwack, 1997).

En los hombres, la producción de T es estimulada por la HL y quizás potenciada por la HEF. En el adulto, la concentración plasmática de T es de 500-700 ng/dL comparado con 30-50 ng/dL en las mujeres. En la rata macho adulto, la concentración plasmática de T es de alrededor de 250 ng/100 mL (Damassa et al., 1977; Lee et al., 1975). La magnitud en la concentración de la T en el macho es la responsable de los cambios en la pubertad que promueven las diferencias sexuales. Sin embargo, conforme el hombre envejece, las concentraciones de T disminuyen gradualmente (Snyder, 2001).

La síntesis de la T (en los testículos) y del E₂ (en los ovarios) comienza con la escisión de la cadena lateral del colesterol por la enzima citocromo P450 scc (desmolasa) lo que resulta en pregnenolona (Sanderson, 2006). En las células de Leydig, la pregnenolona se metaboliza, por medio de dos rutas biosintéticas hasta obtener T (ver figura 2). En las células de la teca, la pregnenolona se metaboliza hasta obtener androstenediona que luego difunden hacia las células de la granulosa donde se aromatiza a estrona o se reduce para obtener T y luego se aromatiza a E₂ en un etapa adicional (Norman y Litwack, 1997).

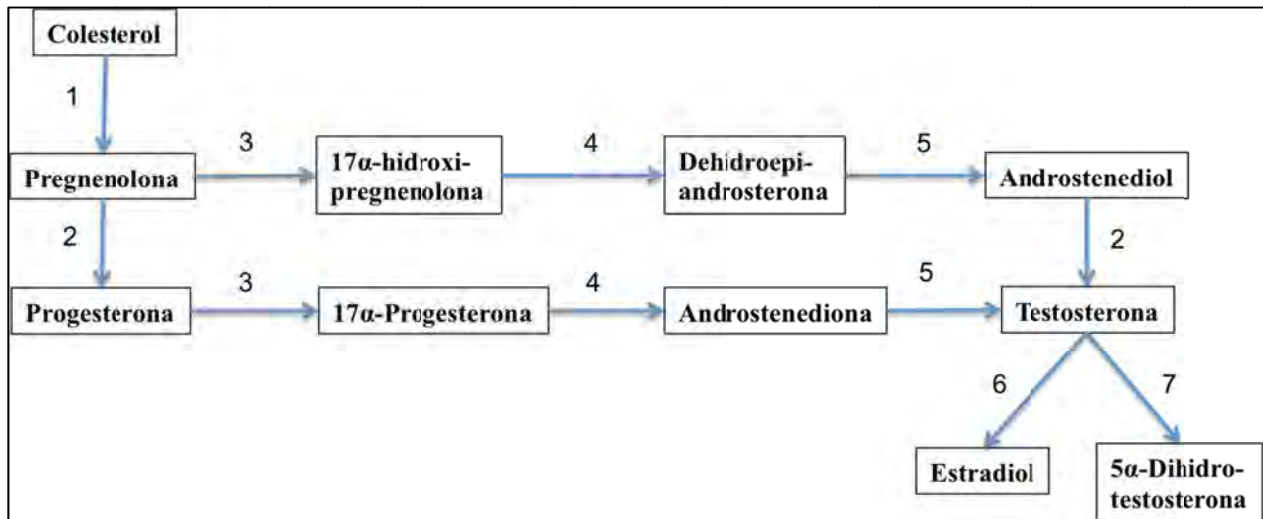


Figura 2. Ruta biosintética de la T y el E₂. Los números indican el nombre de la enzima en cada ruta biosintética. 1: enzima desmolasa; 2: enzima 3β-esteroide deshidrogenasa/isomerasa; 3 y 4: enzima 17α-hydroxilasa/C17-C20 liasa; 5: enzima 17-cetoesteroide reductasa; 6: citocromo P450 aromatasa; 7: 5α-reductasa. (Tomado y modificado de Norman y Litwack, 1997).

Posteriormente, la T (de los testículos) o el E₂ (de los ovarios) difunden al torrente sanguíneo donde se unen a proteínas de unión a hormonas esteroideas y a otras proteínas como la albumina (Snyder, 2001). De hecho, el 98% de la T y el E₂ circulante están unidos a las proteínas y el 2% está libre (es decir, no se une a proteínas). En tejidos blanco, la T o el E₂ libre pueden difundir al interior de las células y unirse a los receptores de andrógenos (RA) o de estrógenos (RE), respectivamente. En la próstata y otros órganos dependientes de andrógenos, la T se reduce por la enzima 5 α -reductasa hacia 5 α -dihidrotestosterona (5 α -DHT) y posteriormente puede unirse al receptor de andrógenos (RA) con mayor afinidad que la T (Snyder, 2001). En varias estructuras cerebrales de mamíferos, la T puede metabolizarse a E₂.

1.3. ENZIMA ESTEROIDOGÉNICA: P450 AROMATASA

Las enzimas involucradas en la ruta metabólica de la T y el E₂ pertenecen a la familia de enzimas citocromo P450. Estas son hemoproteínas intracelulares que activan al oxígeno molecular para el metabolismo oxidativo de una gran variedad de compuestos orgánicos lipofílicos. El término P450 se refiere a la longitud de onda en el cual las hemoproteínas muestran una máxima absorción óptica después de la reducción con monóxido de carbono. En las células eucariontes, las enzimas citocromo P450 existen como hemoproteínas unidas a la membrana y con un hierro-protoporfirina IX como grupo prostético. Están constituidas con alrededor de 500 aminoácidos (aa) y muestran un peso molecular aproximado de 50 kD (Hasler et al., 1999). Para fines de este trabajo, mencionaré algunas características de la enzima citocromo P450 aromatasa (P450arom) cerebral por su importancia en la regulación de procesos fisiológicos y en la expresión de la conducta sexual masculina.

La enzima P450arom cataliza la aromatización de los andrógenos a través de una serie de tres hidroxilaciones secuenciales. Utiliza oxígeno molecular y equivalentes reductores proporcionados por una NADPH-citocromo P450 reductasa ubicua. El resultado es la pérdida de un grupo metilo angular en el carbono 19 y la fenolización del anillo A de los andrógenos. (Cole y Robinson, 1988; Thompson y Siiteri, 1974).

La enzima P450arom, producto del gen *cyp19* localizado en el cromosoma 15q21.2, se localiza en el retículo endoplásmico de las células que la expresan (Simpson et al., 1994). Por ejemplo, la P450arom se expresa en las células granulosas del ovario, en las células de la placenta, en las células de Sertoli y de Leydig, en los adipocitos y en varias estructuras del sistema nervioso central (SNC). En el SNC se ha observado que la actividad de la P450arom no se distribuye de manera homogénea. Es decir, se han observado niveles altos de actividad de la P450arom en el área preoptica medial (APM) y regiones amigdaloides de la rata macho adulto. Mientras que, se ha observado un nivel de actividad de la enzima de moderado a bajo o sin actividad en la pituitaria y otras regiones cerebrales (Roselli y Resko, 1987; 1993). En el diencéfalo de la rata macho, se ha observado que existe un gradiente de actividad P450arom de rostral a caudal y medial a lateral. También se han descrito niveles altos de actividad P450arom en el núcleo lecho de la estría terminal (NLET) y en los núcleos de la amígdala cortical (AMGc) y medial (AMGm). También, se observaron niveles altos de la actividad P450arom en el Núcleo Preóptico Periventricular (NPPeV), en el Núcleo Supraquiasmático (SupQ), en el Hipotálamo Anterior (HA), en el Hipotálamo Anterior Periventricular (HAPeV), en el Núcleo Arcuato (NArc), en la Eminencia Media (EM), el Núcleo Supraóptico (NSupO) y en tejido cortical. En otras áreas y regiones cerebrales se observaron niveles moderados a bajos de la actividad P450arom (Lephart, 1996; Roselli y Resko, 1987; 1993).

En regiones hipotalámicas, pero no límbicas de roedores adultos, la actividad de la enzima P450arom está regulada por hormonas gonadales. Es decir, la castración de ratas macho adultas disminuye la actividad de la enzima (Roselli et al., 1984) y el número de neuronas ir-P450arom (Jakab et al., 1993) en el área preóptica (AP) del hipotálamo, pero no en la AMGm o en el NLET. Dado que el tratamiento con T restablece la actividad de la enzima (Roselli et al., 1984) estos y otros estudios sugieren que en la rata macho adulto, la actividad de la enzima P450arom está modulada por la T a través de un mecanismo que implica la acción del RA (Roselli y Resko, 1984).

1.4. RECEPTORES DE HORMONAS ESTEROIDES: RECEPTOR DE ANDRÓGENOS Y RECEPTOR DE ESTRÓGENOS

Los receptores de hormonas esteroideas sexuales (RHES) pertenecen a la super-familia de receptores nucleares (RN) que actúan como factores de transcripción activados por ligando. Los RHES regulan la expresión de genes blanco y por lo tanto están involucrados en la regulación de procesos como el desarrollo, homeostasis metabólica, balance de sales y en procesos reproductivos (McEwan y Nardulli, 2009). Los RHES comparten una organización estructural común con los RN. Es decir, contienen dominios o regiones estructural y funcionalmente distintos. La región o dominio N-terminal (DNT) son altamente variables en longitud: de menos 50 a más de 500 aa. El receptor contiene, al menos, una región de transactivación constitutivamente activa (AF-1) y varios dominios de transactivación autónomos. El dominio de unión al ADN (DUA) es la región más conservada. Ésta contiene particularmente a la caja P, un motivo responsable de la especificidad de unión al ADN sobre secuencias que contienen comúnmente al motivo AGGTCA. Este dominio también está involucrado en el proceso de dimerización de los RN. La estructura tridimensional del DUA muestra dos módulos en forma de dedos coordinados por zinc. Entre el DUA y el dominio de unión al ligando (DUL) existe una región menos conservada, el dominio o región bisagra (DB). Esta última, es altamente flexible y se encarga de unir a los DUA y DUL. En esta región, se han observado señales de localización nuclear (SLN). El DUL (moderadamente conservado) se localiza en la mitad de la región carboxilo terminal del receptor. El DUL es responsable de muchas funciones, principalmente inducidos por el ligando, en particular la función de activación 2 (AF-2), una interface de dimerización. Además, el DUL contiene una SLN y a menudo una función de represión. Finalmente, los RHES contienen un dominio carboxilo terminal (DCT) del cual se desconoce su función (Huang et al., 2010; McEwan, 2009; Robinson-Rechavi et al., 2003).

1.4.1. El receptor de andrógenos

El RA es una proteína citoplasmica-nuclear, miembro de la familia de receptores nucleares. El RA tiene una longitud de 919 aa y un peso molecular aproximado de 110 kDa (Heinlein y Chang, 2002). En el humano, el gen que codifica al RA se localiza sobre el brazo largo proximal del cromosoma Xq11-12 (Gelman, 2002) (Xq22-32 en la rata). Al igual que los miembros de la familia de RN, el RA contiene un dominio DNT, donde se han encontrado dos regiones discretas que contribuyen a la transactivación. La primera región se localiza entre los aa 141-338 y es requerido para la actividad transcripcional inducido por el andrógeno. Esta región también forma parte de la superficie de interacción del coactivador ARA24 del RA. La segunda región se trata de la función de activación 1 (AF-1) y se localiza entre los aa 360-494. Dentro del AF-1 se ha localizado un motivo, 433(WXXLF)473, que interactúa con el DUL. Esto sugiere que el AF-1 funciona como sitio de interacción de coactivadores y como superficie de interacción entre los dominios amino y carboxilo-terminal (Heinlein y Chang, 2002). El DUA del RA es una región de 68 aa bien conservada el cual se dobla en dos dedos de zinc que reconocen secuencias consenso específicas del ADN (Simental et al., 1991). El RA se une como dímero a los consenso de repetición invertida GGTCAnnnTGTTCT. La región o dominio DB, que conecta a los dominios DUA y DUL, contiene una señal de localización nuclear (SLN) dependiente de ligando. En el DUL del RA se localiza la función de activación 2 (AF-2), responsable de la actividad inducida por el andrógeno. La mutación o eliminación del AF-2 reduce significativamente la activación transcripcional en respuesta al ligando (Heinlein y Chang, 2002). El AF-2 se une, intramolecularmente, al motivo FXXFL del amino-terminal o a proteínas coactivadoras que contienen los motivos LXXLL o FXXFL preferentemente. En este dominio también se ha localizado una señal de exporte nuclear dependiente del ligando (Gelman, 2002).

Al unirse el andrógeno al RA localizado en el citoplasma, el RA se disocia de proteínas de choque térmico y pasa de un estado conformacional inactivo a un estado activo (Brinkmann, 2001). Posteriormente, el complejo andrógeno-RA se trasloca al núcleo donde se une a otro complejo andrógeno-RA. Luego, el homodímero se une al elemento de respuesta al andrógeno del ADN y de esta manera regula la expresión de genes, entre ellos su propio gen (Brinkmann, 2001; Carson-Jurica et al., 1990; Zhang et al., 2004).

El RA se expresa en órganos y tejidos sensibles a andrógenos tales como en los órganos reproductivos (ovario, útero, epidídimo, glándula preputial y sebácea, próstata, vesícula seminal, testículos, conducto deferente), tejido endócrino (glándula adrenal, glándula tiroides, páncreas), tejido metabólico (lengua, estomago, duodeno, yeyuno, íleo, colon, vejiga, hígado, riñón), tejido adiposo, tejido inmune (bazo, glándula del timo), sistema respiratorio (aorta, corazón, pulmón), tejido esquelético (huesos, músculo esquelético, piel) y en el SNC (tallo cerebral, cerebelo, cuerpo estriado, bulbos olfatorios, médula espinal, glándula pituitaria, hipotálamo) (Bookout et al., 2006).

Particularmente, se ha observado que el ARNm del RA se expresa densamente en áreas cerebrales involucrados en el control hormonal de la conducta copulatoria tales como el APM, el Núcleo Ventromedial del Hipotálamo (NVMH), en los Núcleos del Septum Lateral (NSL), en los núcleos de la AMGm y AMGc, el Área Amígdalo-Hipocampal (AAH) y el NLET (Fernandez-Guasti et al., 2010). En núcleos involucrados en procesos neuroendocrinos, tales como los núcleos Anteroventral Periventricular (AVPV) y NArc, el ARNm del RA se expresa moderadamente. Las células que expresan al ARNm-RA fueron encontrados en regiones olfatorias de la corteza y en los bulbos olfatorios (BO). También fue observado expresión del ARNm del RA en regiones involucradas en el relevo central de la información somatosensorial como en los núcleos mesencefálicos del nervio trigémino, en los núcleos ventral-talámico y en los cuernos dorsal de la médula espinal. Así como también el ARNm del RA se expresa en otras regiones involucrados en el procesamiento sensorial y en motoneuronas somáticas del tallo cerebral. Esto sugiere que el RA modula una amplia variedad de funciones neuronales (Simerly et al., 1990).

Diversos estudios han demostrado que en diferentes áreas cerebrales, los niveles de expresión del RA dependen del andrógeno. Por ejemplo, en el NLET, en el APM, en el NSL, en el NVMH y la AMGm de la rata y del ratón, los niveles de expresión del RA disminuyen 24 h después de la castración, pero se restablece con la administración de T o 5 α -DHT (Lu et al., 1998; Lynch y Story, 2000).

1.4.2. El receptor de estrógenos

El receptor de estrógenos (RE), al igual que el RA, pertenece a la familia de RN que funcionan como factores de transcripción. En la rata y otros mamíferos, se ha observado que existen dos tipos de RE: el RE α y el RE β . En humanos, el RE α tiene una longitud de 595 aa y un peso molecular aproximado de 66 kDa. El RE α está codificado por el gen ESR1 localizado en el cromosoma 6q24-q27. En cambio, el RE β comprende una longitud de 530 aa con un peso molecular de 54 kDa. El gen del RE β está codificado en el gen ESR2 localizado en el cromosoma 14q21-q22.

Los dos REs muestran un 97% de similitud en la secuencia de aa del DUA, un 56% de similitud en la secuencia de aa del DUL, mientras que en el DNT sólo se observa una similitud del 24%. La activación transcripcional del RE α está mediado por dos funciones de activación distintas: el AF-1 (localizado en el DNT) y el AF-2 (localizado en el DCT). En el RE β el AF-1 es más débil que el del RE α . Esto sugiere que la función de activación transcripcional del RE β depende más de la AF-2 que del AF-1. Los REs actúan como dímeros para regular la activación transcripcional. Los REs se unen a elementos de respuesta a estrógenos (ERE; GGTCAnnnTGACC) consenso de sus genes blanco (revisado por Dahlman-Wright et al., 2006) para modular la transcripción de genes blancos de los REs.

Los REs se expresan en diferentes tejidos. Por ejemplo, el RE α se expresa principalmente en el ovario (células de la teca), en el útero, en la próstata, en las células de Leydig de los testículos, en el epidídimo, en los huesos, en las glándulas mamarias, en el hígado, en el tejido adiposo blanco y en varias regiones cerebrales (Dahlman-Wright et al., 2006). El RE β se expresa principalmente en el colon, en el epitelio de la próstata, en los testículos, en las células granulosas de los ovarios, en la médula ósea, en las glándulas salivares, en el endotelio vascular y en ciertas regiones cerebrales (revisado por Dahlman-Wright et al., 2006).

En el SNC de la rata, las células que expresan a los REs se distribuyen ampliamente en el cerebro con mayor densidad en las células del hipotálamo y regiones del telencéfalo que proveen proyecciones al hipotálamo (Simerly et al., 1990). Por ejemplo, en los BO, corteza cerebral, NSL,

APM, NLET, AMGm, Núcleo paraventricular del hipotálamo (NPVH), tálamo (Th), área tegmental ventral (ATV), sustancia nigra (SN), rafe dorsal (RD), locus coeruleus (LC) y cerebelo. El RE α se expresa predominantemente en el hipocampo, en el AP y en el hipotálamo (Mitra et al., 2003). Al igual que el ARNm del RA, el ARNm del RE α también se expresa en áreas cerebrales que participan en la regulación de la conducta sexual masculina como el NLET, el APM, el NVMH y la AMGm (Fernandez-Guasti et al., 2010).

1.5. REGULACIÓN HORMONAL DE LA CONDUCTA SEXUAL MASCULINA

Estudios clásicos han mostrado que uno de los substratos biológicos de la conducta sexual es el sistema endocrino. Por ejemplo, Berthold (1849) observó que en gallos, la remoción de los testículos elimina la conducta sexual. En cambio, si los testículos sólo se cambian de lugar dentro de la misma cavidad abdominal, los gallos no pierden la conducta sexual. El análisis post-mortem reveló que los testículo se habían revascularizado sin evidencia de un restablecimiento de las conexiones nerviosas. Esto sugirió que los testículos secretan un factor que estimula la conducta sexual y que se transmite por la sangre (revisión en Agmo, 2007).

En mamíferos, la primera evidencia experimental sobre el papel de las hormonas gonadales en la modulación de la conducta sexual masculina, fue proporcionada por Steinach en el año 1894. Steinach observó que las ratas macho perdían la capacidad de cópula (monta, intromisión y eyaculación) algún tiempo después de la remoción de los testículos. Años más tarde, Nissen (1929) observó que en ratas macho castrados, la inhibición sexual producida por la castración se revertía con la administración del factor transmitido por la sangre sugerido por Berthol en 1849. Poco tiempo después, en 1935, el factor producido por las células del testículo y transmitido por la sangre fue identificado y llamado testosterona (T). Estudios posteriores confirmaron que la T, base o en forma de esteres de propionato, inducía conducta copulatoria en ratas macho previamente castrados. La importancia de la T en la modulación de la conducta copulatoria fue confirmada en otras especies de mamíferos como en el jerbo, cobayo, ratones, hámsteres y otros (revisión en Agmo, 2007).

Aunado a la pérdida de la conducta copulatoria por la castración, también se ha observado que el componente motivacional de la conducta sexual depende de las hormonas gonadales. Por ejemplo, en ratas macho castrados, la preferencia de olores por una hembra en estro (Harding y McGinnis, 2003), las conductas de marcado de territorio (Harding y Velotta, 2011; Matochik y Barfield, 1991), las conductas de olfacción y búsqueda o las vocalizaciones ultrasónicas de 50 KHz se eliminan (Harding y McGinnis, 2003). Al igual que el componente consumatorio de la conducta sexual, el motivacional se restablece con la administración de T (Matochik y Barfield, 1991) en machos castrados.

En la década de 1960 se descubrió que la T se metaboliza a 5α -dihidrotestosterona (5α -DHT) por la enzima 5α -reductasa o a E_2 por la enzima P450arom. Más aun, ambas enzimas fueron localizadas en distintas áreas cerebrales involucradas en la modulación de la conducta sexual masculina (Lephart, 1993; Naftolin et al., 1975). Estos hallazgos sugirieron que la acción de la T sobre la estimulación de la conducta sexual puede ser a través de uno de estos dos metabolitos. McDonald et al. (1970) observaron que en ratas macho castradas, la administración sistémica de $125 \mu\text{g}/\text{día} \times 8$ días de 5α -DHT no revierte la inhibición sexual producida por la castración. En cambio, Baum (1979) observó que la administración de una dosis más alta ($1 \text{ mg}/\text{día}$ por 17 días) de 5α -DHT induce intromisiones y eyaculaciones en el 25% de los machos castrados. En el mismo trabajo Baum (1979) observó que la administración de metiltrienolona (R-1881: $1 \text{ mg}/\text{día}$ por 17 días) un andrógeno no aromatizable y que no se metaboliza a androstanediol, estimula las intromisiones en un número mayor de ratas macho castrados que la 5α -DHT, aunque el porcentaje de machos que eyacularon fue similar entre ambos grupos. Estos resultados sugieren que ni los andrógenos 5α -reducidos ni los 3α - o 3β -androstanediones participan en la activación de la conducta sexual de la rata macho.

Por otra parte, estudios clásicos han demostrado que el E_2 estimula la conducta sexual de la rata macho. Por ejemplo, Davidson (1969) observó que en ratas macho castrados, la administración de $200 \mu\text{g}/\text{día}$ de benzoato de estradiol (BE) restaura las intromisiones y eyaculaciones en el 67% y 33% de los machos, respectivamente. Más aun, dosis inferiores ($10 \mu\text{g}/\text{día}$) de BE induce montas e intromisiones como la T (Pfaff, 1970). De hecho, se ha observado que todas las ratas macho castrados tratadas con $100 \mu\text{g}/\text{día}$ por 24 días de BE eyaculan al menos una vez

(Sodersten, 1973). En ratas macho castrados sin experiencia sexual, la administración de aminoglutetimida (inhibidor de la enzima P450arom) previene el despliegue de la cópula en respuesta al tratamiento con T (Beyer et al., 1976; Morali et al., 1977). Estudios posteriores confirmaron que en ratas macho C castrados, la administración intracerebroventricular de fadrozole (inhibidor de la enzima P450arom) previene la restauración de la cópula inducida por el implante sc de cápsulas silásticas de T. Más aun, se ha observado que en las ratas macho castrados tratados con T, la inhibición sexual inducida por el implante intracerebroventricular de fadrozole se revierte con la administración sc de E₂ (Vagell y McGinnis, 1997). Por su parte, Roselli et al. (2003) observaron que en ratas macho intactos con capsulas de Silastic conteniendo T, el tratamiento crónico con fadrozole reduce significativamente el numero de montas, intromisiones y de eyaculaciones; mientras que, aumenta las latencias de monta, intromisión y eyaculación. De hecho, Roselli et al. (2003) observaron que en las ratas macho intactas tratadas con T y fadrozole, el tratamiento subsecuente con E₂ restaura, al menos parcialmente, el numero de montas e intromisiones, pero no el numero de eyaculaciones. Estos estudios sugieren que la aromatización de la T a E₂ participa en la modulación de la conducta sexual de la rata macho.

En ratones macho carentes de los exones 1 y 2 del gen *cyp19* (ArKO), se observó que el 58% de los machos no monta a hembras sexualmente receptivas. El resto de los machos ArKO mostraron latencias de monta mayor y una frecuencia de monta menor que los machos silvestres o heterocigotos (Honda et al., 1998). Más aun, se observó que los macho ArKO no muestran preferencia por el olor de una hembra en estro sobre el olor de un macho intacto (Bakker et al., 2002). En los ratones macho ArKO, el tratamiento con BE induce conducta copulatoria, pero no tiene efecto sobre la preferencia de pareja o por el olor de hembra en estro (Bakker et al., 2004). Esto sugiere que la deficiencia conductual en los ratones macho ArKO se debe a la falta de un efecto activacional del E₂. En su conjunto, estos estudios demuestran que la aromatización de la T a E₂ es importante para el despliegue de la conducta sexual masculina. Es decir, que en la rata y el ratón macho, la conducta sexual está mediada, al menos parcialmente, por el E₂.

En otros trabajos se ha observado que la inhibición sexual producida por la castración se restaura completamente con la administración de ambos metabolitos de la T. Por ejemplo, Baum y Vreeburg (1973) observaron que las ratas machos castrados tratados con 2 µg/día de BE

combinado con 200 μg de propionato de $5\alpha\text{-DHT}$ se eyacularon de forma similar a los machos tratados con propionato de testosterona (PT). Larsson et al. (1973a; b) observaron que el tratamiento combinado de E_2 (5 o 50 $\mu\text{g}/\text{día}$) más $5\alpha\text{-DHT}$ (1 $\text{mg}/\text{día}$) restablece las montas, intromisiones y eyaculaciones en la mayoría de los machos prepuberalmente castrados. Estudios más recientes demostraron que en ratas macho castrados, el tratamiento crónico con E_2 , a dosis fisiológicas, aumenta el porcentaje de machos que montaron, pero no el de intromisión ni el de eyaculación ni la preferencia por una hembra sexualmente receptiva en una prueba de motivación sexual incentiva. Mientras que, el tratamiento combinado de E_2 más $5\alpha\text{-DHT}$ restaura la conducta copulatoria y la preferencia de pareja como la que se observa en machos intactos (Attila et al., 2010). Estos resultados apoyan la idea de que la expresión de la conducta sexual masculina en las ratas, requiere de la acción conjunta de la T y el E_2 .

1.5.1. Mecanismo de acción de la T y del E_2 sobre la modulación de la conducta sexual masculina

Numerosos estudios han demostrado que la T y el E_2 modulan la conducta sexual del macho a través de su interacción con sus propios receptores: el RA y el $\text{RE}\alpha$, respectivamente. Más aun, diferentes estudios han observado que el RA y el $\text{RE}\alpha$ se expresan en neuronas de áreas cerebrales implicadas en la modulación de la conducta sexual. Por ejemplo, McGinnis y Mirth (1986) han mostrado que en ratas macho castrados, la restauración de la conducta sexual inducida por la administración de T es inhibida con la administración de hidroxiflutamida (OHF o Sch 16423), un antagonista del RA, y que los niveles altos del RA inducida por la T se correlacionan con niveles altos de conducta sexual, apoyando un papel crítico para la interacción de la T con el RA en la mediación de la respuesta copulatoria. De hecho, en el APM, pero no en el NSL de ratas macho castradas tratadas subcutáneamente con T, el implante de OHF previene la restauración de la conducta copulatoria (McGinnis et al., 2002). Por otro lado, en ratas macho castrados tratados con T, la administración de ICI-46474 o CI-628, antagonistas del RE, producen un efecto depresor significativo, sobre la conducta de cópula (Beyer et al., 1976; Luttge, 1975).

Adicionalmente, los ratones macho carentes del gen que codifica al RA (KO-RA) o del RE α (KO-RE α) no muestran conductas de monta, intromisión o eyaculación (Ogawa et al., 1997; Sato et al., 2004; Wersinger et al., 1997). En ratas macho intactas, se observó que la infusión bilateral en el APM, pero no en la AMGm del oligonucleótido antisentido al ARN mensajero del RE α , redujo significativamente, la frecuencia de montas, intromisiones y eyaculaciones (Paisley et al., 2012). En conjunto, estos estudios muestran que en la rata macho, la conducta sexual depende de un RA y RE α funcional y que la participación de estos receptores sobre la modulación de la conducta sexual masculina depende del área cerebral donde se expresan.

1.6. REGULACIÓN NEURAL DE LA CONDUCTA SEXUAL MASCULINA

Los primeros estudios para entender la organización neuronal implicada en el control de la conducta sexual en animales macho se hizo por lesiones grandes de áreas cerebrales. Por ejemplo, se ha observado que en ratas o gatos macho la remoción de la neocorteza suprime la conducta de cópula y la mayor deficiencia se observa con la remoción de la corteza frontal (Beach, 1940). Las lesiones subcorticales, a menudo removiendo varias áreas cerebrales, también producen pérdida de la conducta sexual (Hull et al., 2006). Diferentes técnicas de lesiones cerebrales, en conjunto con las técnicas electrofisiológicas e inmunohistoquímicas han identificado y descrito un grupo de estructuras cerebrales involucradas en la modulación de la conducta sexual masculina. Estas estructuras cerebrales forman un circuito neuronal conocido como sistema de proyección vomeronasal (SPV) que incluye: al sistema olfatorio accesorio (SOA), al APM, al NVMH, a la AMGm y al NLET, entre otras. En los párrafos siguientes se describe brevemente las evidencias que demuestran la participación de las principales estructuras del SPV en el control de la conducta sexual masculina.

1.6.1. Sistema olfatorio

El sistema olfatorio (SO) se encarga de la percepción de los olores. Estos son percibidos por el sistema olfatorio principal (SOP) y el accesorio (SOA). El SOP comprende al epitelio olfatorio principal (EO, localizado en la cavidad nasal) que envía eferencias sensoriales a las neuronas mitrales y empenachadas del bulbo olfatorio principal (BOP). A su vez, las neuronas mitrales y

empenachadas del BOP envían sus eferencias a la corteza piriforme, al tubérculo olfatorio, a la AMGc (anterior, posterolateral) y a la transición corticoamigdalina (figura 3). En cambio, el SOA comprende al órgano vomeronasal (OVN, localizado bilateralmente en la parte ventral del septum nasal) constituido por neuronas sensoriales. Las neuronas sensoriales de la parte apical del OVN proyectan sus axones a las neuronas mitrales y empenachadas de la parte anterior del BOA. Mientras que, las neuronas sensoriales de la parte basal del OVN envían eferencias a la parte posterior del BOA (Liman, 1996; Xia et al., 2006). En conjunto, las neuronas mitrales y empenachadas del BOA anterior y posterior, proyectan sus eferencias, exclusivamente, al NLET, a los núcleos del tracto olfatorio accesorio (NAOT), a los núcleos amigdaloides medial (AMGma y AMGmp) y a los núcleos amigdaloides cortical posteromedial (PMCN). Las neuronas de estas áreas, a su vez, proyectan a núcleos hipotalámicos tales como al APM, al NVMH y a núcleos supraópticos y premamilares, los cuales están asociados con la conducta sexual, de agresión y parentales (Dulac y Wagner, 2006; Martinez-Marcos, 2009) (figura 3).

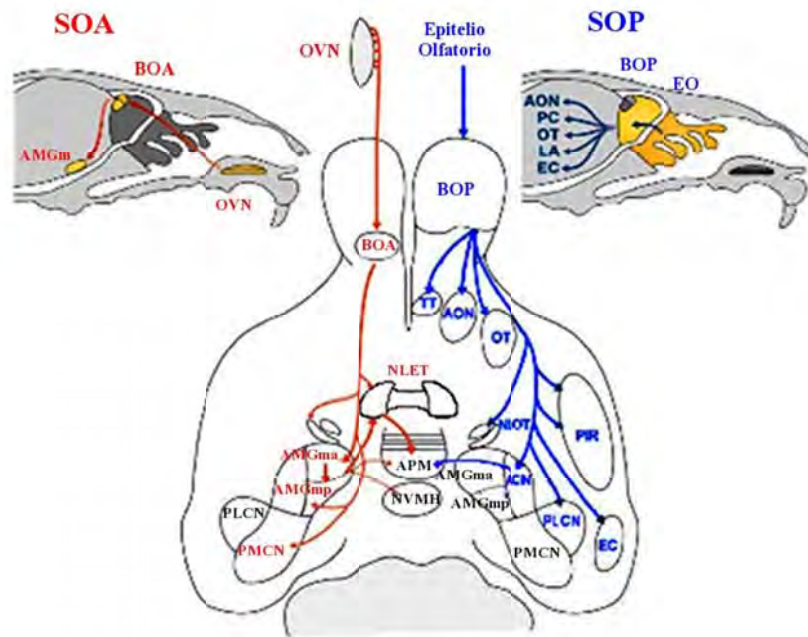


Figura 3. Representación esquemática de las rutas de proyección del sistema olfatorio accesorio (SOA) (del lado izquierdo y en rojo) y del sistema olfatorio principal (SOP) (del lado derecho y en azul). AMGma o AMGmp: amígdala medial anterior o posterior; PLCN o PMCN: núcleo amigdaloides cortical posterolateral o posteromedial; EO: epitelio olfatorio; TT: la tenia tecta; AON: núcleo olfatorio anterior; OT: tubérculo olfatorio; NLOT: núcleo del tracto olfatorio lateral; PIR: corteza piriforme; ACN: núcleo cortical anterior; EC: corteza entorrinal. Tomado y modificado de Dulac y Wagner (2006).

Numerosos estudios han demostrado que en muchas especies de mamíferos como hurones, hámsteres, ratas y otros, las señales olfatorias están involucradas en la selección apropiada de la pareja sexual (Curtis et al., 2001). Los machos pasan más tiempo cerca de una hembra en estro (Agmo, 2003) y las hembras pasan más tiempo cerca de un macho sexualmente activo (Dominguez-Salazar et al., 2002). Inclusive, los machos prefieren a una hembra receptiva aunque ésta esté anestesiada o detrás de una malla en donde los machos sólo pueden olerla (Carr et al., 1965).

Estudios realizados en ratones, ratas y campañoles macho, han demostrado que la remoción quirúrgica del OVN disminuye marcadamente la conducta de apareamiento y agresiva intraespecies, lo que sugiere que el SOA está involucrado en la detección de olores sexualmente relevantes (Clancy et al., 1984). Por ejemplo, en el hámster macho, el corte del nervio vomeronasal, con una navaja, elimina la expresión de la conducta sexual en el 40% de los machos. Mientras que, la destrucción de la mucosa olfatoria con sulfato de zinc no altera la conducta copulatoria. En cambio, si las lesiones del OVN incluyen la mucosa olfatoria, la conducta copulatoria se elimina en el 100% de los machos (Winans y Powers, 1977), similar a la remoción bilateral de los BO (Murphy y Schneider, 1970). Esto sugiere una coparticipación del OVN y la mucosa olfatoria en el reconocimiento de señales sexualmente relevantes.

Más aun, se ha demostrado que la importancia del OVN en la modulación de la conducta sexual depende de la experiencia sexual. En el hámster macho sin experiencia sexual, la remoción del OVN elimina completamente la cópula, (Meredith, 1986). En ratas macho sexualmente expertos, las lesiones del OVN no elimina la cópula con hembras sexualmente receptivas (Kondo et al., 2003). Estos hallazgos sugieren que el OVN es importante para la ejecución de la cópula en el primer encuentro sexual, pero no para los subsecuentes encuentros.

1.6.2. Área preóptica medial

El AP es una región cerebral que se localiza en la parte anterior del hipotálamo. El AP consiste de cuatro núcleos: mediana (MD), lateral (L), paraventricular (PV) y medial (M). El AP participa en la regulación de diversas funciones, tales como la termorregulación y en la homeostasis del sueño (parte mediana y lateral) (Boden et al., 2000), en la liberación de varias hormonas hipofisarias (Pi y Grattan, 1999), la conducta maternal (Stack et al., 2002) y la conducta sexual masculina (Paredes y Baum, 1997) (parte medial). Las lesiones bilaterales o grandes (extendiéndose al hipotálamo anterior rostral) del APM deterioran severamente la conducta copulatoria en diferentes especies tales como: ratas, hámsteres, ratones, cobayos, gerbos, perros, gatos, cabras, monos rhesus, lagartos y peces macho (Hull et al., 2006). Si las lesiones son pequeñas o unilaterales se producen deficiencias poco severas en la conducta copulatoria; pero, si son extensas la conducta se inhibe por completo y de forma permanente (Paredes, 2003) . Debido a la severidad de los efectos de las lesiones del APM y a la variedad de especies en las que los efectos de estas lesiones han sido descritos, a esta región se le considera de gran importancia en la regulación neural de la conducta sexual masculina (Paredes, 2003). Por ejemplo, en ratas macho con lesiones en el APM, se ha observado que ni la exposición a diferentes hembras sexualmente receptivas (Heimer y Larsson, 1967), ni el tratamiento crónico con T o la administración de choques eléctricos de baja intensidad a los flancos son capaces de reactivar la conducta sexual (Meisel, 1983). También, se ha observado que las ratas macho sexualmente expertas con lesiones en el APM modifica su preferencia olfatoria de tal manera que pasan el mismo tiempo oliendo el aserrín de hembras en estro o en anestro (Hurtazo y Paredes, 2005). Esto sugiere que el APM es una estructura crucial para la integración de los estímulos sensoriales que determinan en un individuo la preferencia olfatoria por el sexo opuesto (Hurtazo y Paredes, 2005). En la misma línea, se ha demostrado que la estimulación eléctrica del APM de ratas machos intactas acelera la cópula hasta la eyaculación reduciendo el número de montas, intromisiones, la latencia de eyaculación y el intervalo post- eyaculatorio (Malsbury, 1971).

Estudios inmunohistoquímicos han demostrado que las neuronas del APM se activan durante la cópula o por olores sexualmente relevantes. Por ejemplo, se ha observado que en el APM de ratas macho C que intrometen o eyaculan, el número de células inmunorreactivas (ir) a la proteína Fos (marcador de actividad neuronal) es mayor que en los machos sin acceso a hembras

sexualmente receptivas o aquellos machos mantenidos en una caja de cópula con aserrín limpio. De hecho, en el APM de ratas macho C, el nivel de expresión de Fos se correlacionó con la intensidad de la actividad sexual. Esto es, en el APM de ratas macho C que eyacularon hasta dos veces mostraron mayor número de células ir-Fos que los machos que intrometieron una sola vez o aquellos que intrometieron 5 veces (Baum y Everitt, 1992). Nosotros, hemos observado que en el APM de ratas macho C, la exposición a la cama de aserrín de hembras en estro, pero no a la cama de aserrín limpia, aumentó significativamente el número de células ir-Fos (Portillo et al., 2006b; Portillo y Paredes, 2004). Estos estudios sugieren que el APM de la rata macho está involucrada en la modulación del componente motivacional y de ejecución de la conducta sexual.

Los estudios con implantes hormonales intracerebrales han mostrado que la modulación de la conducta sexual del APM de la rata macho depende de hormonas. Esto es, estudios clásicos han demostrado que en el APM de ratas macho C castrados, el implante bilateral de T o E₂ estimula la conducta sexual (Christensen y Clemens, 1974; Johnston y Davidson, 1972; Lisk, 1967). Por otro lado, se ha observado que en ratas macho C castrados tratados subcutáneamente con 5 α -DHT, el implante de E₂ en el APM induce conducta eyaculatoria en el 60 % de estos machos en, al menos, 40% de las pruebas post-implante (Davis y Barfield, 1979). En ratas macho gonadalmente intactos, el implante bilateral sc de E₂ en el APM y de fadrozole mantiene la conducta de monta y parcialmente las eyaculaciones, lo que sugiere una participación importante de las neuronas del APM que expresan al RE en la modulación de la conducta sexual (Clancy et al., 2000). En conjunto, estos resultados sugieren que la modulación de la conducta sexual masculina del APM depende de la activación androgénica y estrogénica.

1.6.3. Núcleo Ventromedial del Hipotálamo

En la rata, el NVMH es reconocido principalmente por su papel en el control de la conducta sexual femenina (Mathews et al., 1983), pero también modula la conducta sexual masculina. Las lesiones del NVMH a menudo estimulan aspectos de la actividad sexual masculina, lo que sugiere que el NVMH inhibe tónicamente la conducta sexual masculina (Hull et al., 2006). Al respecto, pequeñas lesiones electrolíticas en el NVMH de la rata macho castrada y tratada con T exógena, reduce la latencia a la expresión de la conducta copulatoria (Christensen et al., 1977).

De manera similar al APM, el NVMH es rico en RA y RE (Simerly et al., 1990) y recibe estímulos genitosensoriales a través de proyecciones del mesencéfalo, así como estímulos quimiosensoriales vía proyecciones de la AMG (Canteras et al., 1995).

Estudios previos han demostrado que, al igual que en ratas machos castrados tratados sc con T, en el NVHM de ratas macho castrados, el implante de propionato de T (PT) restaura la preferencia de pareja, pero no la conducta de cópula (Harding y McGinnis, 2003). Más aun, se ha observado que la T ejerce su efecto a través del RA. Es decir, en el NVMH de ratas macho C castrados, tratados sc con T, el implante de OHF inhibe la restauración de la preferencia de pareja y la preferencia de lugar condicionada (Harding y McGinnis, 2004). En ratones macho castrados, el implante de T incrementa el marcaje con orina (Nyby et al., 1992). Lo anterior sugiere que el NVMH contribuye a la motivación sexual dependiente de T.

1.6.4. Amígdala medial

La amígdala (AMG) es una estructura cerebral en forma de almendra localizada en el lóbulo temporal medial. Consiste de un conjunto de más de 10 núcleos que se dividen en tres grupos. El grupo profundo o basolateral de la AMG incluye a los núcleos laterales (AMG_l), a los núcleos basales (AMG_b) y núcleos accesorios basales (AMG_{ab}); el grupo superficial o tipo cortical comprende a los núcleos corticales (AMG_c) y núcleos del tracto olfatorio lateral (NLOT); y el grupo centromedial incluye a los núcleos central (AMG_{ce}) y medial (AMG_m) (Sah et al., 2003). La AMG se ha relacionado con la regulación del aprendizaje y la memoria, con las funciones autonómicas y neuroendocrinas (núcleo central y división baso-lateral) y con varias conductas sociales (división corticomedial) (Newman, 1999). Entre estos últimos procesos se incluyen las emociones, la agresión y la conducta sexual (Hull et al., 2006).

En los hámsteres o en las ratas macho las lesiones de la AMG basolateral no producen efecto perjudicial sobre la cópula; por el contrario, se ha sugerido que las ratas macho con lesiones en la AMG basolateral copulan más rápidamente que los machos control (Harris y Sachs, 1975). En cambio, en ambas especies, lesiones en la AMG corticomedial producen deficiencias en la conducta copulatoria (revisado en Hull et al., 2006).

Al igual que en el APM, en la AMGm, la mayoría de las neuronas ir-Fos, también son ir a RHES (Greco et al., 1998). Además, se ha descrito que esta región cerebral es sexualmente dimórfica (siendo más grande en machos que en hembras) y que en la rata hembra adulta el implante de T aumenta su tamaño (Cooke et al., 1999). Funcionalmente, en la AMGm de la rata macho castrada, el implante bilateral de T retrasa la pérdida de la cópula y de las erecciones sin contacto (Bialy y Sachs, 2002). Igualmente, en la AMGm de la rata macho castrada, el implante de E₂ estimula las montas (Rasia-Filho et al., 1991). Por otro lado, en la AMGm de ratas macho castrados tratados sistémicamente con una dosis subumbral de E₂, el implante unilateral de 5 α -DHT fue suficiente para estimular la conducta copulatoria (Baum et al., 1982). Por lo tanto, la estimulación de los RA y RE en la AMGm de la rata macho contribuyen a la activación de la conducta copulatoria.

1.6.5. Núcleo lecho de la estría terminal

La estría terminal es un sistema de fibras principales que conecta recíprocamente a la AMG con otras estructuras límbicas (de Olmos, 1972). El NLET, al igual que la AMG, es una región cerebral heterogénea con subnúcleos funcional y anatómicamente distintos (Alheid et al., 1995).

El NLET juega un papel modulador en el control de la conducta sexual. Particularmente, la región posteromedial del NLET se ha relacionado con la modulación de la conducta sexual masculina (Emery y Sachs, 1976). En la rata macho, las lesiones del NLET inducen deficiencias en el inicio de la cópula como un incremento en el número de intromisiones y falta de eyaculación en algunos machos (Emery y Sachs, 1976). Más aún, se ha observado que las lesiones del NLET de ratas macho, disminuye las erecciones sin contacto (Liu et al., 1997). En el hámster macho, las lesiones electrolíticas del NLET disminuye las investigaciones ano-genitales (Powers et al., 1987). Adicionalmente, en nuestro laboratorio, hemos observado que en el NLET de ratas macho C, la exposición a cama de aserrín de hembra en estro, pero no la cama de aserrín limpio aumenta el número de células ir-Fos (Portillo et al., 2006b). Estos estudios sugieren que el NLET participa en la modulación del componente motivacional de la conducta sexual del macho.

1.7. MACHOS COPULADORES LENTOS (CL)

La mayoría de las ratas macho eyaculan después de un promedio de 10 intromisiones en un intervalo de 2-10 minutos (conocidos como machos sexualmente expertos; SE) (Hull et al., 2006). Sin embargo, existen ratas machos que montan e intromiten pero que no eyaculan en pruebas de 30 min o que toman más tiempo en eyacular (Damassa et al., 1977; Kohlert y Bloch, 1996; Pattij et al., 2005; Portillo et al., 2006b). Más aun, se ha descrito la presencia de machos que no montan ni intromiten ni eyaculan después de varias sesiones de pruebas de cópula con una hembra sexualmente receptiva (Portillo y Paredes, 2004; Whalen et al., 1961). Los machos que no eyaculan en pruebas de cópula de 30 min se les conoce como copuladores lentos (CL), mientras que los machos que no copulan se les conoce como no copuladores (NC). Este tipo de variación en el desempeño sexual también se ha descrito en otras especies de mamíferos como en gerbos (Clark y Galef, 2000), cobayos (Harding y Feder, 1976), monos Rhesus (Phoenix y Chambers, 1988) y carneros (Alexander et al., 1999).

Se ha descrito que en las ratas macho CL no muestran alteraciones en la atención selectiva o en la capacidad de aprender una tarea de evitación activa (Kohlert y Bloch, 1996). Además, estos machos CL no muestran deficiencias en la actividad general, en la actividad locomotora o en las conductas de evitación-aproximación (Pattij et al., 2005). Estas evidencias sugieren que los machos CL no tienen una deficiencia cognitiva que pudiera explicar la falta de eyaculación.

En estudios previos, hemos demostrado que las ratas macho CL muestran una clara preferencia por interactuar con una hembra sexualmente receptiva o por el olor de la cama de hembras en estro en comparación con el olor de una cama de hembras en anestro o limpia. Sin embargo, el tiempo que pasan los machos CL investigando el olor de la cama de hembra en estro fue significativamente menor que los machos SE. Esta diferencia conductual no se explica por alteraciones en su sistema olfatorio o en el procesamiento de olores sexualmente relevantes: las estructuras de la ruta de proyección vomeronasal se activan de igual forma en machos CL y SE (Portillo et al., 2006b). Esto fue confirmado cuando observamos que los machos CL pueden discriminar entre olores no sexuales y olores sexualmente relevantes usando una prueba de habituación-desahbituación. En el mismo estudio, demostramos que las hembras sexualmente

receptivas pasan el mismo tiempo en la zona incentivada de los machos CL y de los machos SE, sugiriendo que para la hembra, los machos CL son igual de atractivos que los machos SE (De Gasperin-Estrada et al., 2008).

La deficiencia en la conducta eyaculatoria tampoco se asocia con alteraciones en la concentración plasmática de T o E₂. Por ejemplo, Damassa et al. (1977) observaron que entre las ratas macho que no intromiten y las que intromiten, en varias pruebas de cópula con una hembra sexualmente receptiva, la concentración plasmática de T fue similar. Además, nosotros observamos que entre los machos que eyaculan en 3 pruebas de cópula con una hembra sexualmente receptiva y aquellos machos que no lo hacen, la concentración plasmática de T y de E₂ fue similar (Portillo et al., 2006b).

Estudios previos que evalúan el efecto de las hormonas sobre el desempeño sexual de las ratas macho no diferencian claramente entre machos no copuladores, aquellos machos que no muestran monta, intromisión o eyaculación en varias pruebas con una hembra sexualmente receptiva, de los machos CL. Por ejemplo, Damassa et al. (1977) clasificaron como NC a aquellos machos que no intromitieron en ninguna de 7 pruebas de cópula, pero no especificaron si estos machos no montaron. De igual forma, Craig et al. (1954) clasificaron a ratas macho como no reproductores o CL si después de ser expuestos a diferentes hembras en varios periodos de estro las hembras no quedaban preñadas. Aunque estos machos no preñaran a las hembras está claro que pudieron mostrar montas, intromisiones e inclusive eyacular.

1.8. MACHOS NO COPULADORES (NC)

Los machos no copuladores, como se mencionó arriba, son aquellos machos que no muestran conducta copulatoria a pesar de ser probados varias veces con hembras sexualmente receptivas. Al igual que en los machos CL, los machos NC han sido descritos en diferentes especies como en ratas, jerbos, cobayos y ratones (Canseco-Alba y Rodríguez-Manzo, 2013; Portillo et al., 2013). Aun se desconocen las causas de esta deficiencia conductual. Por ejemplo, se ha mostrado que en

la rata macho NC, la concentración plasmática de T o E₂ es similar a lo observado en machos C (Portillo et al., 2007; Stefanick y Davidson, 1987; Whalen et al., 1961).

En ratas macho C castrados, el tratamiento con PT restaura la conducta sexual, pero este tratamiento no induce la conducta sexual en ratas macho NC castradas o NC intactos (Portillo y Paredes, 2003; Whalen et al., 1961). Además, las ratas macho NC, permanecen sin mostrar conducta copulatoria después de un tratamiento con PT inclusive después de 5 minutos de estar presionando la cola con una pinza, un procedimiento que facilita la conducta sexual en machos C (Larsson, 1979). Aunque, en machos C castrados el PT restaura la preferencia de pareja y olfatoria a hembras receptivas, en machos NC castrados éste tratamiento no induce una preferencia por las hembras receptivas o por su olor (Portillo y Paredes, 2003; Whalen et al., 1961). Estos resultados sugieren, que la falta de cópula no se debe a una alteración androgénica.

Pottier y Baran (1973) observaron que las ratas macho NC mostraron menos actividades generales como la exploración de la cámara, inmovilidad, conductas dirigidas hacia las hembras y auto-acicalamiento que los machos C. Es decir, las ratas macho NC son menos activos y responden menos a estímulos nuevos. Aun más, si los machos NC responden a la novedad, la habituación es lenta comparada con los machos C. Adicionalmente, Pottier y Baran (1973) observaron que los machos NC muestran índices de emocionalidad o estados de salud similar a los machos C. Los datos obtenidos por Pottier y Baran (1973) indican que la rata macho NC muestra un síndrome conductual general que la distingue del macho C. Este síndrome no copulador está caracterizado por una inactividad relativa que parece reflejar una refractariedad a estímulos nuevos.

Otros estudios han mostrado que la falta de cópula en estos animales, no se explica por una disfunción peneana; es decir, el número de reflejos peneanos y la emisión seminal espontánea es similar a los machos C (Stefanick y Davidson, 1987). Nosotros, hemos demostrado que los machos NC no están feminizados. Es decir, en las ratas macho NC previamente castrados, el tratamiento con E₂ más progesterona (P4) induce un coeficiente e intensidad de lordosis similar a lo observado en los machos C, pero significativamente menor que las hembras ovariectomizadas con el mismo tratamiento hormonal (Portillo y Paredes, 2003).

En nuestro laboratorio hemos demostrado que los machos NC no muestran preferencia por una hembra sexualmente receptiva en pruebas donde ellos pueden escuchar, ver y oler a una hembra en estro o un macho sexualmente activo, pero donde el contacto físico no es posible ya que los animales están separados por una malla de alambre. También, demostramos que los machos NC muestran una preferencia significativamente reducida a olores de una hembra en estro en comparación a los machos C (Portillo y Paredes, 2004). Estas observaciones sugieren que la falta de cópula en estos animales se debe a una alteración en el componente motivacional de la conducta sexual. Con la finalidad de determinar si la baja motivación sexual mostrada por los machos NC es debida a una deficiencia en el procesamiento de claves olfatorias sexualmente relevantes evaluamos la activación de las estructuras cerebrales que integran el SOA ante estímulos sexualmente relevantes o estímulos no sexuales. Encontramos que, en la capa de células mitrales del BOA de las ratas macho NC expuestas al aserrín de hembra en estro, pero no en otras estructuras cerebrales del SOA, el número de células ir-Fos fue mayor que en el grupo control expuestos a aserrín limpio. En cambio, en todas las estructuras del SOA de los machos C expuestos a aserrín de hembra en estro el número de células ir-Fos fue mayor que en el grupo control expuestos a aserrín limpio. Estos resultados sugieren que el sistema olfatorio de la rata macho NC es funcional y que la deficiencia sexual está relacionado a alteraciones en la actividad neuronal de otras áreas cerebrales (Portillo y Paredes, 2004). Por ejemplo, en el APM y en la AMGm de los machos NC hemos observado una expresión diferencial del RA y del RE α . Es decir, encontramos que en el APM y en la AMGm, pero no en las capas celulares mitral o granular del BOA o en el NLET de los machos NC el número de células ir-RA fue mayor que en los machos C. En cambio, el número de células ir-RE α fue menor en el APM de los machos NC que en los machos C; mientras que, en la AMGm el número de células ir-RE α fue mayor que en los machos C (Portillo et al., 2006a). Más aún, en un estudio posterior, observamos que en el APM, pero no en otras estructuras cerebrales de los machos NC existe una menor actividad de la enzima aromatasa que en los machos C (Portillo et al., 2007). En su conjunto, estos estudios sugieren que en el APM de los machos NC existe una alteración funcional asociada a la falta de cópula.

2. JUSTIFICACIÓN

Existen ratas macho saludables que montan, intromiten pero no eyaculan (CL) en pruebas de cópula de 30 min o más con hembras sexualmente receptivas. Más aun se ha observado que existen ratas macho que no copulan (NC) a pesar de ser probados repetidamente con hembras sexualmente receptivas. La deficiencia copulatoria en estos machos no se explica por alteraciones en la concentración plasmática de T o E₂. De hecho, la administración sistémica de T no induce la eyaculación en los machos CL o la cópula en los machos NC sugiriendo que la deficiencia conductual no se debe a una alteración androgénica. En cambio, nosotros hemos observado que en el APM de los machos NC existe una menor actividad de la enzima P450arom comparado con los machos C, un número mayor de células ir-RA y un número menor de células ir-RE α . Por lo tanto, si en los machos CL la falta de eyaculación se debe a una deficiencia en la actividad de la enzima aromatasa similar a los machos NC, la administración sistémica de E₂ inducirá la conducta eyaculatoria como en los machos C. Con base en las evidencias ya mencionadas, en un segundo objetivo evaluamos el efecto del implante de E₂ o T en el APM de ratas macho NC sobre la conducta de cópula.

3. HIPÓTESIS

3.1. En las ratas macho copuladores lentos, la administración sistémica de E_2 inducirá la conducta eyaculatoria.

3.2. En las ratas macho no copuladores, el implante de E_2 en el APM inducirá la conducta de cópula.

4. OBJETIVOS

4.1. GENERAL

4.1.1. Determinar el efecto de la administración de testosterona o de estradiol sobre la conducta de cópula en las ratas macho copuladores lentos y no copuladores.

4.2. PARTICULARES

4.2.1. Evaluar el efecto de la administración sistémica de E_2 o T sobre la conducta eyaculatoria de ratas macho copuladores lentos.

4.2.2. Evaluar el efecto del implante de E_2 o T en el APM o en el NVMH o en la AMGm de ratas macho copuladores castrados sobre la conducta de cópula.

4.2.3. Determinar si el implante de E_2 o T en el APM de ratas macho no copuladores induce conducta sexual.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. GENERALES

5.1.1. Sujetos

Los sujetos fueron ratas macho adultos de la cepa Wistar con peso corporal promedio de 380-400 g. Los animales fueron colocados en cajas de acrílico (4 animales por caja) a 21 ± 1 °C bajo un ciclo de 12 h luz-12 h oscuridad invertido. Las luces se encendían a las 10:00 h y se apagaban a las 22:00 h. Los animales tuvieron libre acceso a comida y agua. Los estímulos sexuales fueron ratas hembra adultas de la misma especie ovariectomizadas (OVX) al menos 2 semanas antes de ser utilizadas. La receptividad de las hembras fue inducida con BE (25 µg/rata sc 48h antes de la prueba copulatoria) y P4 (1 gm/rata sc 4h antes de la prueba copulatoria).

5.1.2. Pruebas de cópula

Una sesión de cópula consistió en colocar a una rata macho dentro de una caja de acrílico (40 x 60 x 40 cm). Después de un periodo de cinco minutos de adaptación se introdujo a una hembra sexualmente receptiva. En cada sesión de cópula se registró la latencia de monta (LM), la latencia de intromisión (LI), la latencia de eyaculación (LE) y el número de montas (NM) y de intromisiones (NI) previos a la eyaculación. Los animales fueron observados por 30 min o hasta la primera intromisión después de la eyaculación.

5.2. EXPERIMENTO 1: RATAS MACHO CL

5.2.1. Pruebas de selección

Todas las ratas macho sin experiencia sexual fueron sometidos a 5 sesiones de cópula, a intervalos de 48 h entre sesión. Los machos con una latencia de eyaculación menor de 15 min en, al menos, las últimas tres de las cinco sesiones fueron considerados como sexualmente expertos

(SE). Los machos que montaron, intromitieron pero que no eyacularon en 4 de las 5 sesiones fueron considerados como copuladores lentos (CL).

5.2.2. Tratamiento hormonal

Una semana después de la última sesión de cópula de selección, los macho CL recibieron implantes subcutáneos de cápsulas de Silastic (2 cm de largo; 1.98 mm de diámetro interno; 3.18 mm de diámetro externo) con E₂ (n=10) o T (n=9) o vacías (n=9).

5.2.3. Pruebas de conducta sexual post-implante hormonal

Comenzando una semana después del implante hormonal, los macho CL fueron sometidos a 7 pruebas de cópula, una por semana, con una hembra sexualmente receptiva. Al final del experimento, los machos CL fueron pesados y sacrificados con una sobredosis (32 mg/rata) de pentobarbital sódico. Posteriormente los testículos, la próstata, el epidídimo, las vesículas seminales fueron disecados y se determinó el peso de cada uno de estos tejidos.

5.2.4. Análisis estadístico

El porcentaje de ratas macho CL que montó, intromitió o eyaculó con los diferentes tratamientos hormonales fueron comparados con la prueba estadística Chi cuadrada y las diferencias entre grupos fue determinada con la prueba estadística de Fisher. Los parámetros de la cópula no se distribuyeron de manera homogénea; por lo tanto, fueron comparados con el análisis de varianza de rangos de Kruskal-Wallis seguido por la prueba de Dunn. En cambio, el peso corporal, testicular, de la próstata, del epidídimo y de las vesículas seminales de las ratas macho CL se distribuyeron homogéneamente y fueron comparados por medio de un análisis de varianza de una vía seguido por la prueba de Tukey. Todas las pruebas estadísticas empleadas fueron llevadas a cabo con el paquete estadístico SigmaPlot para Windows versión 11.0 (Build 11.2.0.5 Systat Software, San Jose, CA).

5.2.5. Resultados

5.2.5.1. Efecto de la T o E₂ sobre la conducta de cópula de las ratas macho CL

Las ratas macho CL fueron observados en un total de 12 pruebas de cópula: 5 pruebas de cópula de selección y 7 pruebas semanales de cópula después del implante sc de T o E₂.

Previo al implante hormonal, los machos CL desplegaron montas e intromisiones de forma inconsistente y eyacularon sólo en una de cinco sesiones. Posterior al implante hormonal, los machos CL tratados con T y los controles mostraron un patrón de montas e intromisiones más consistentes. El 60% de los machos CL control eyaculó después de la cirugía. El tratamiento crónico con T o E₂ no modificó el porcentaje de ratas macho CL que montan o intromiten. En cambio, el porcentaje de ratas macho CL tratados con E₂ que eyaculó fue menor en las pruebas 8 (vs control), 9 (vs T), 12 y 13 (vs T y control) (ver figura 4).

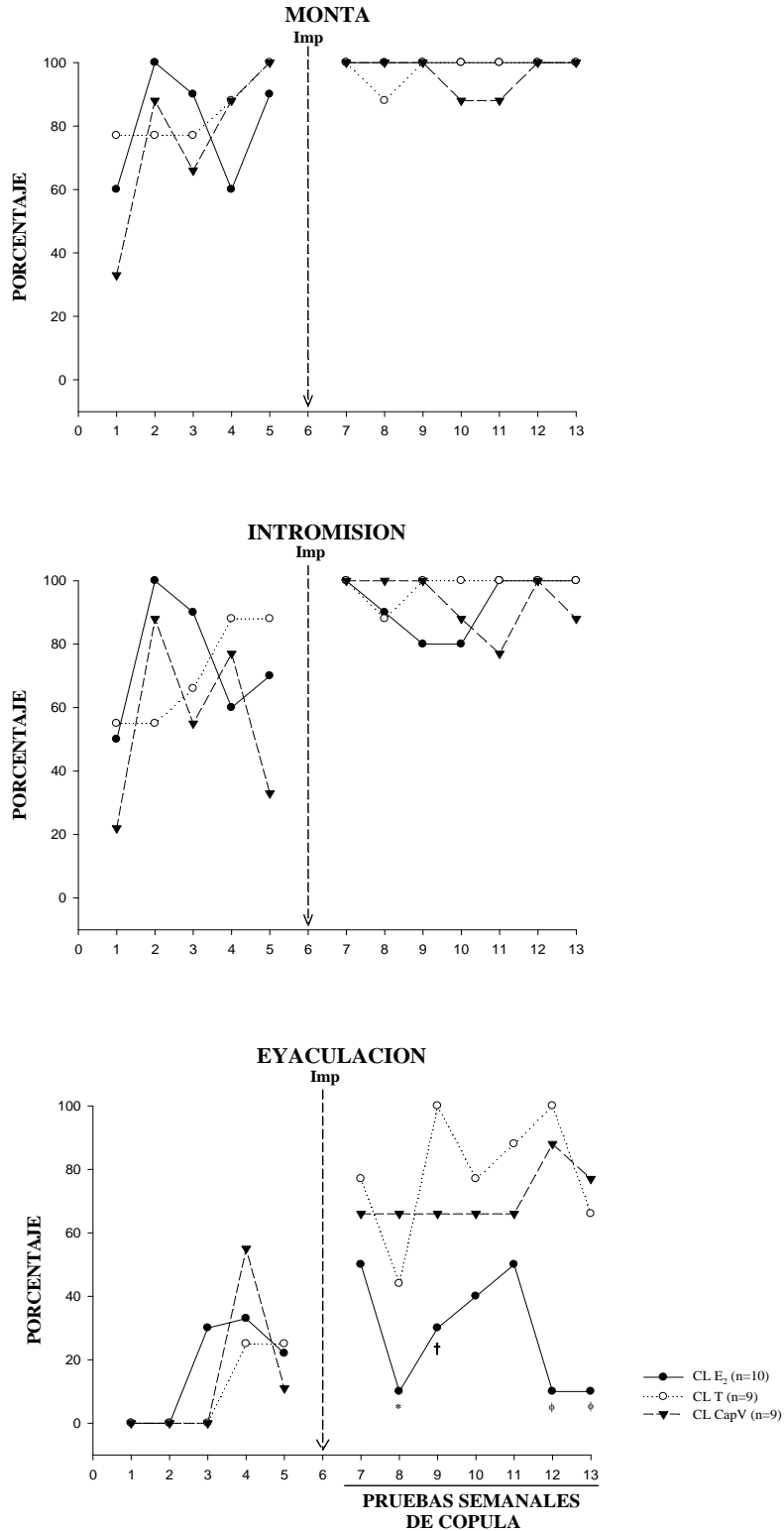


Figura 4. Porcentaje de ratas macho CL que montaron, intromitieron o eyacularon previo y posterior al implante sc de E₂ (n=10) o T (n=9) o capsulas vacías (n=9). La flecha indica el inicio del tratamiento hormonal. * diferente del grupo control (CL CapV): p<0.05; † diferente del grupo tratado con T (CL T): p<0.05; φ diferente de todos: p<0.05.

5.2.5.2. Efecto de la T o el E₂ sobre los parámetros copulatorios de las ratas macho CL

El NM fue significativamente diferente entre los grupos en las pruebas semanales de cópula 11 (KW H:13,473; p=0.001), 12 (KW H:11,790; p=0.003) y 13 (KW H:10,407; p=0.005). Los machos CL tratados con E₂ mostraron mayor NM en las pruebas semanales de cópula 11, 12 y 13 que los machos del grupo control y en la prueba 12 con respecto a los machos CL tratados con T (tabla 1). Las ratas macho CL no mostraron diferencias consistentes en las LM o LI. Excepto que, los machos CL tratados con T mostraron una menor LM en la prueba semanal de cópula 8 con respecto al grupo control. Mientras que, los machos CL tratados con E₂ mostraron una LI mayor en la prueba semanal de cópula 13 con respecto al grupo tratado con T o control (tabla 2).

Tabla 1. Parámetros de la cópula en ratas macho CL en las diferentes sesiones.

Sesión de Cópula	Número de montas						Número de intromisiones					
	CapV	n	T	n	E ₂	n	CapV	n	T	n	E ₂	n
1	6.0 ± 2.6	4	33.0 ± 12.2	7	26.2 ± 6.9	6	12.0 ± 4.0	2	4.4 ± 1.5	5	11.8 ± 2.6	5
2	21.5 ± 2.6	8	25.4 ± 6.2	7	22.8 ± 6.4	10	10.5 ± 2.3	8	13.0 ± 2.8	5	8.0 ± 1.7	10
3	15.6 ± 2.8	6	37.2 ± 13.9	6	29.8 ± 4.8	9	11.6 ± 3.8	5	10.0 ± 2.5	6	16.2 ± 4.8	9
4	26.3 ± 3.3	8	26.4 ± 8.4	8	31.5 ± 4.3	7	20.9 ± 2.8	7	17.2 ± 5.1	6	14.4 ± 3.4	7
5	9.0 ± 3.2	9	23.0 ± 7.6	9	28.0 ± 6.1*	10	15.7 ± 4.4	3	9.4 ± 2.0	8	8.9 ± 2.2	8
6. Inicio del tratamiento hormonal												
7	12.4 ± 2.6	9	17.9 ± 5.4	9	23.9 ± 5.0	10	13.3 ± 2.0	9	13.1 ± 1.4	9	11.5 ± 2.1	10
8	11.9 ± 3.0	9	24.3 ± 8.5	9	36.3 ± 9.7	10	9.3 ± 2.1	9	9.1 ± 1.3	8	12.1 ± 2.4	9
9	12.0 ± 5.5	9	23.3 ± 5.8	9	23.7 ± 6.5	10	10.7 ± 1.6	9	12.7 ± 2.7	9	11.9 ± 2.8	8
10	14.4 ± 3.9	8	15.2 ± 2.6	9	19.4 ± 3.7	10	12.6 ± 4.2	8	15.2 ± 3.4	5	21.8 ± 3.8	8
11	5.9 ± 1.1	8	11.6 ± 2.7	9	23.2 ± 4.2*	10	11.3 ± 1.5	7	14.1 ± 2.2	9	12.0 ± 2.1	10
12	10.3 ± 3.2	9	9.1 ± 1.9	9	25.7 ± 3.6 ϕ	10	9.8 ± 1.3	9	11.6 ± 1.7	9	18.0 ± 3.0	10
13	6.9 ± 1.9	9	10.6 ± 2.3	9	19.3 ± 3.1*	10	11.3 ± 1.4	8	11.1 ± 1.6	9	10.6 ± 1.7	10

Número promedio ± error estándar de montas e intromisiones de ratas macho CL antes y después del tratamiento hormonal. * Diferente de CapV: p<0.05; ϕ Diferente de los grupos CapV y T: p<0.05.

Tabla 2. Latencias de monta, intromisión y de eyaculación en ratas macho CL en las diferentes sesiones.

Sesión de Cópula	Latencia de monta			Latencia de intromisión			Latencia de eyaculación					
	CapV	T	E ₂	CapV	T	E ₂	CapV	<i>n</i>	T	<i>n</i>	E ₂	<i>n</i>
1	108.3 ± 27.1	152.1 ± 91.4	127.5 ± 41.8	376.0 ± 107.0	656.4 ± 305.7	202.0 ± 66.5	---		---		---	
2	123.8 ± 41.1	83.3 ± 28.5	439.3 ± 180.5	267.6 ± 64.6	339.4 ± 200.5	516.0 ± 175.5	---		---		---	
3	186.3 ± 104.1	320.9 ± 184.3	74.2 ± 21.9	164.8 ± 64.3	472.0 ± 233.5	273.8 ± 101.4	---		---		1203.0 ± 394.7	3
4	322.9 ± 176.5	198.9 ± 138.4	101.8 ± 26.5	212.7 ± 128.8	250.7 ± 152.3	337.4 ± 186.6	1318.4 ± 168.9	5	770.0 ± 140.0	2	1037.0 ± 243.9	3
5	109.8 ± 48.1	133.5 ± 60.8	146.1 ± 58.1	113.3 ± 26.2	373.1 ± 162.5	180.7 ± 52.7	616.0	1	1112.5 ± 223.5	2	1093.0 ± 282.0	2
6. Inicio del tratamiento hormonal												
7	171.0 ± 68.8	58.0 ± 25.4	65.7 ± 19.2	263.0 ± 153.0	162.1 ± 85.7	209.6 ± 113.8	652.0 ± 98.0	6	721.6 ± 106.6	7	953.0 ± 110.7	5
8	177.7 ± 69.1	25.3 ± 11.1*	74.0 ± 19.0	546.3 ± 194.1	108.6 ± 35.5	198.8 ± 66.3	781.0 ± 128.4	6	529.0 ± 231.3	4	1546.0	1
9	73.9 ± 27.9	20.7 ± 8.2	92.6 ± 44.3	196.4 ± 88.5	39.9 ± 15.0	271.0 ± 115.8†	480.5 ± 87.4	6	868.3 ± 149.2	9	932.0 ± 126.0	3
10	63.9 ± 23.7	217.3 ± 140.4	136.6 ± 65.9	260.6 ± 165.1	228.2 ± 148.8	143.5 ± 67.0	737.7 ± 174.3	6	714.4 ± 110.7	7	853.0 ± 170.3	4
11	260.6 ± 159.9	77.4 ± 66.2	26.0 ± 8.1	109.0 ± 57.6	101.3 ± 85.2	147.0 ± 47.5	770.8 ± 103.6	6	725.1 ± 124.5	8	1124.8 ± 219.6	5
12	47.6 ± 20.4	57.7 ± 48.2	44.0 ± 15.7	100.4 ± 34.1	60.7 ± 47.8	84.9 ± 22.7	771.8 ± 106.6	8	500.0 ± 88.0	9	1438.0	1
13	113.2 ± 72.5	52.8 ± 35.1	69.9 ± 18.0	46.8 ± 21.8	103.1 ± 32.4	381.7 ± 127.6φ	697.0 ± 139.6	7	667.5 ± 151.7	6	1484.0	1

Latencia promedio (± error estándar) de monta o de intromisión o de eyaculación de ratas macho CL antes y después del tratamiento hormonal.* Diferente de CapV:

p<0.05; φ Diferente de los grupos CapV y T: p<0.05.

5.2.5.3. Efecto de la T o E₂ sobre la masa corporal y de los órganos sexuales accesorios de las ratas macho CL

Al final del periodo de evaluación, observamos que las ratas macho CL tratados con E₂ mostraron significativamente menor peso corporal y de los órganos sexuales accesorios que las ratas macho CL control (CL CapV) o tratados con T (CL T). En los machos CL tratados con T, el tamaño de los testículos fue significativamente menor que el grupo control (figura 5).

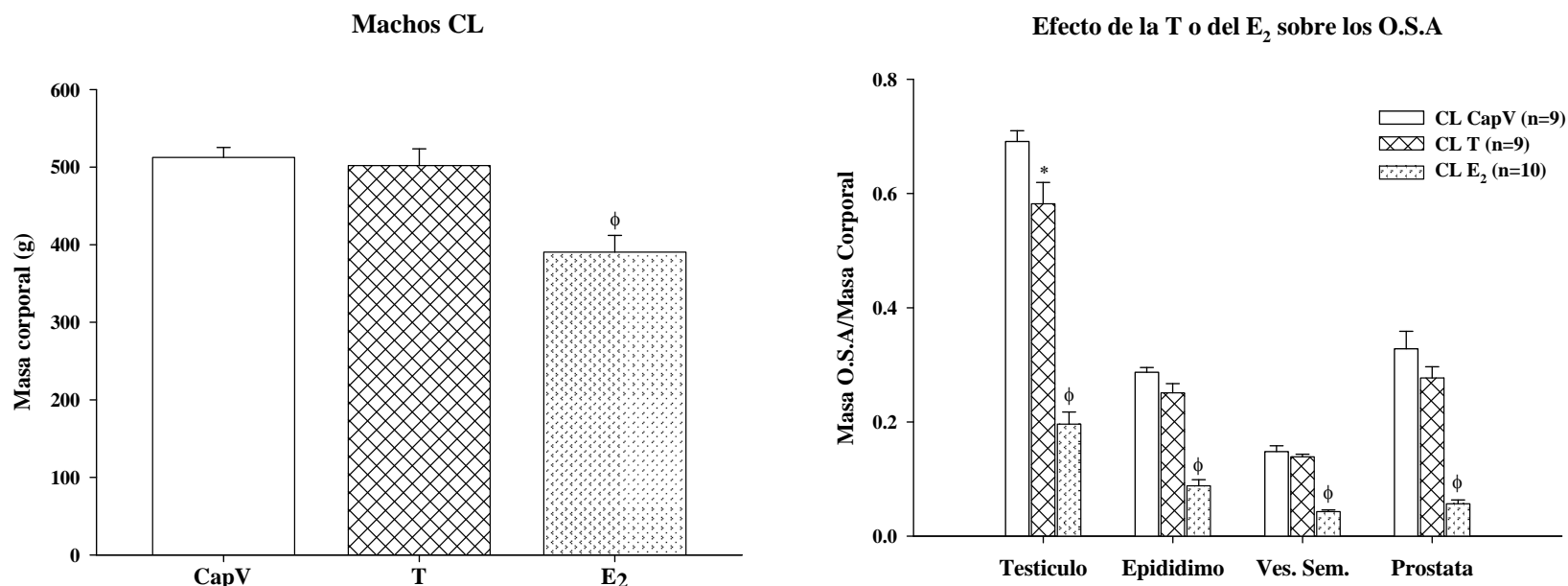


Figura 5. Masa corporal y de órganos sexuales accesorios (O. S. A.) de las ratas macho CL al final del periodo de observación. * diferente del grupo CapV: P<0.05. ^φ diferente de los grupos CV y T: P<0.05.

5.2.6. Discusión

Los resultados del presente estudio demuestran que las ratas machos CL montan e intrometen pero sólo una pequeña proporción eyacula previo al tratamiento hormonal. En estudios previos, observamos que estos machos eyaculan infrecuentemente o no eyaculan inclusive después de pruebas repetidas por más de 9 semanas (Portillo et al., 2006b). En el presente experimento expandimos esas observaciones a doce pruebas copulatorias (5 pruebas de selección y 7 pruebas con el correspondiente implante) y observamos que alrededor del 67% los machos CL muestran el patrón motor de eyaculación, de los cuales sólo dos machos eyacularon en todas las pruebas (33%). También observamos que el tratamiento crónico con T no afecta el desempeño sexual de los machos CL, mientras que el E₂ disminuye el porcentaje de machos CL que eyaculan. Además, observamos que los machos CL tratados con E₂ mostraron un menor peso corporal y de los órganos sexuales secundarios que los otros grupos.

Estudios previos han demostrado que en machos CL, la administración sistémica de dosis altas de T no mejora el desempeño sexual. Por ejemplo, en ratas macho que mostraron nula conducta copulatoria en pruebas preliminares de cópula, la administración de PT indujo conducta copulatoria pero en menor frecuencia que lo normal (Stone, 1938). En ratas macho que no mostraron intromisiones en pruebas preliminares de cópula y que posteriormente fueron castrados para eliminar la fuente de T, el implante sc de cápsulas de Silastic con T, los cuales producían 5.18 ng/mL de T plasmática, indujo conducta eyaculatoria en 2 de 6 animales. Los machos CL que eyacularon mostraron eyaculación en todas las pruebas subsecuentes. Sin embargo, en los experimentos de Damassa et al. (1977) no fue posible distinguir los efectos de la prueba sexual repetida de aquellos inducidos por la exposición constante de T. Resultados similares han sido observados en otras especies de mamíferos. En los macacos Rhesus macho (*Macaca mulatta*) que sólo eyacularon en el 50% de las pruebas sexuales preliminares, la administración diaria de 1 mg/kg por 35 días de T no aumentó el desempeño sexual (Phoenix y Chambers, 1988). En su conjunto estos resultados sugieren que la falta de eyaculación de los machos CL no se debe a una alteración androgénica.

Este trabajo es el primero en evaluar el efecto del E₂ sobre la conducta eyaculatoria de las ratas macho CL. Como se mencionó en párrafos anteriores, el implante sc de E₂ en cápsulas de Silastic, reduce el porcentaje de ratas macho CL que eyaculan. Resultados similares fueron observados en ratas macho SE gonadalmente intactos tratados con 200 µg de BE por diez días (Davidson, 1969). En contraste, otros estudios muestran que el tratamiento con 200 µg/kg de BE por tres semanas a ratas macho gonadalmente intactos no induce cambios significativos en la conducta sexual (Sodersten, 1973). Esta discrepancia probablemente se deba a diferencias en las dosis de BE administradas a los sujetos.

Además, los datos del presente trabajo mostraron que en los machos CL el tratamiento crónico con E₂, la masa corporal y la masa de los órganos sexuales accesorios fue menor que en los machos CL tratados con T o control. Resultados similares fueron obtenidos por Davidson (1969) y Sodersten (1973). Estos sugiere que el efecto inhibitorio del E₂, en el presente trabajo, sobre la respuesta eyaculatoria de los machos CL podría estar asociado, como ha sido puntualizado por Davidson (1969), a una disminución en la síntesis de T por los testículos, como consecuencia de un efecto inhibitorio del E₂ sobre el eje hipotálamo-hipófisis-testículos (Gans, 1959). Como hemos mencionado en la introducción, el despliegue de la conducta sexual masculina requiere de la acción de la T y del E₂ en las áreas cerebrales involucradas en la modulación de esta conducta y/o en los tejidos dependientes de andrógenos como los órganos sexuales accesorios. En el presente trabajo observamos que los machos CL tratados con E₂, el peso de los órganos sexuales secundarios fue menor que en los machos con capsulas vacías o machos con capsulas con T. Sin embargo, el hecho de que una alta proporción, más del 80%, de machos CL tratados con E₂ desplegaran montas e intromisiones sugiere que el E₂ es capaz de mantener la conducta sexual, pero no es capaz de reducir el umbral de eyaculación.

Es probable que la falta de eyaculación, característica de los machos CL, se deba a una alteración, durante el desarrollo, de los circuitos neuronales que controlan la eyaculación. Por ejemplo, las ratas macho que fueron tratados con un antiandrógeno en la etapa prenatal, muestran disminución en la conducta coital cuando son adultos (Clemens et al., 1978; Dominguez-Salazar et al., 2002). Por otro lado, ratas macho adultos tratados perinatalmente

con ATD (inhibidor de la enzima P450arom) muestran una clara preferencia por machos estímulo en lugar de hembras receptivas (Dominguez-Salazar et al., 2002). Además, estos machos muestran conductas de montas e intromisiones similar a los machos control, pero su capacidad para eyacular está reducida (Brand et al., 1991). Resultados similares han sido descritos en los ratones que carecen del gen *cyp19* que codifica para la enzima P450arom. En la edad adulta, estos machos no eyaculan y muestran montas e intromisiones reducidas en pruebas de cópula con hembras sexualmente receptivas (Honda et al., 1998; Toda et al., 2001).

También, es probable que la falta de eyaculación, característica de los machos CL, se deba a que la conducta sexual no sea placentera para estos machos o bien que el procesamiento de información sensorial proveniente del pene este alterado. Ambas posibilidades deberán evaluarse en futuros estudios.

5.3. EXPERIMENTO 2. RATAS MACHO NC

5.3.1. Pruebas de selección

Todas las ratas macho sin experiencia sexual fueron sometidos a 5 sesiones de cópula, a intervalos de 48 h entre sesión. Los animales fueron observados por 30 min o hasta la primera intromisión después de la eyaculación. Los machos con una LE menor a 15 min en, al menos, las últimas tres de las cinco sesiones fueron considerados como machos C o SE. Los machos que no mostraron conducta copulatoria en ninguna de las 5 sesiones fueron considerados como NC.

5.3.2. Cirugía y tratamiento hormonal

Las ratas macho C fueron castrados y una semana más tarde fueron sometidos a 3 sesiones semanales de cópula. Posteriormente, estos machos recibieron implantes bilaterales de cánulas guías de calibre 22 (C232G-1.0 Cann guide DBL, Plastics One, Inc., Roanoke, VA). En algunos grupos las cánulas quedaron vacías y en otros contenían T o E₂. Todos los grupos se implantaron de acuerdo a las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson (2005) en alguna de las siguientes estructuras: APM (0.5 mm posterior a Bregma; ± 0.5 mm lateral a la línea media; -7.6 sobre la duramadre) o en el NVMH (2.56 posterior a Bregma; ± 0.5 lateral a la línea media; -8.8 mm sobre la duramadre) o en la AMGm (2.56 mm posterior a Bregma; ± 3.3 mm lateral a la línea media; -8.2 mm sobre la duramadre) (figura 6). Las ratas macho NC recibieron implantes bilaterales de cánulas con T o E₂ o cánulas vacías en el APM (figura 6). La T o el E₂ se introdujeron en el lumen de las cánulas guías siguiendo el método de Davis y Barfield (1979) con pequeñas variaciones. El extremo de la cánula sin cubierta de plástico (pedestal), fue presionado por 1 segundo por 30 veces sobre una capa de T o E₂ en cristal. La cantidad de T o E₂ en el lumen de las cánulas guías se determinó por diferencia de peso de las cánulas guías antes y después de las 30 presiones. La castración en los machos C y el implante intracerebral en los machos C y NC se llevó a cabo bajo anestesia profunda con una mezcla de Ketamina (95 mg/kg) y Xilazina (12 mg/kg).

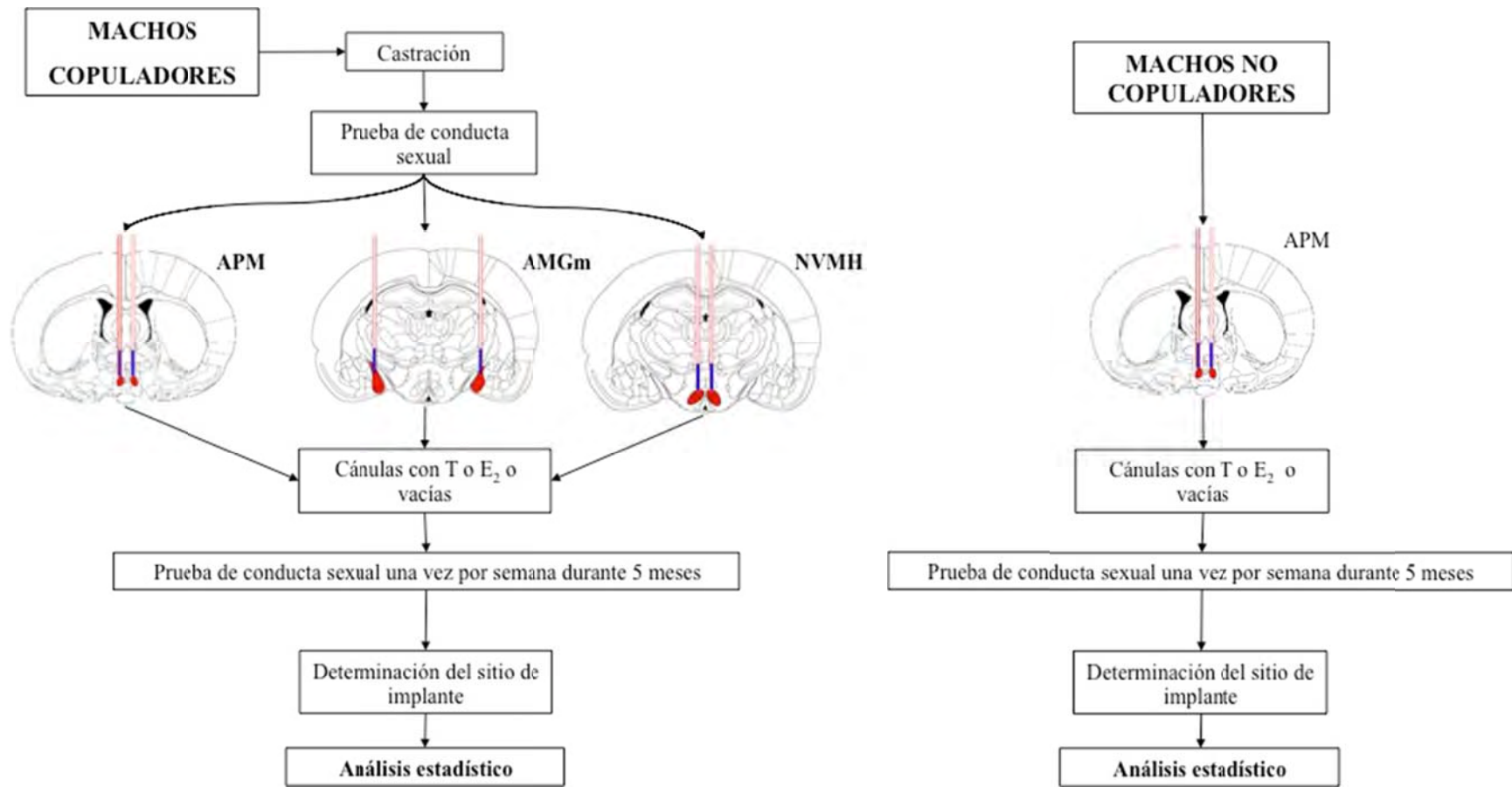


Figura 6. Esquema experimental de trabajo para las ratas macho C y NC en el experimento 2.

5.3.3. Diseño experimental

Los machos C y los machos NC fueron divididos en grupos de acuerdo al tratamiento y al área cerebral del implante de las cánulas bilaterales como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Grupos experimentales de ratas macho C castrados y ratas macho NC. Cada sujeto recibió un solo tratamiento hormonal en una sola área cerebral.

	APM			NVMH			AMGm		
Machos	T	E ₂	CV	T	E ₂	CV	T	E ₂	CV
C	9	9	7	7	4	2	5	4	2
NC	5	6	3	NP	NP	NP	NP	NP	NP

NP: No probado.

5.3.4. Pruebas de conducta sexual post-implante hormonal

Iniciando una semana después del implante intracerebral de las cánulas bilaterales, los machos C y NC fueron sometidos a pruebas semanales de cópula con una hembra sexualmente receptiva por un periodo de 5 meses (figura 6). Al final del experimento los machos C castrados y los NC fueron anestesiados con pentobarbital sódico y perfundidos intracardiamente con solución salina y *para*-formaldehído al 4% en PBS 0.1M. Posteriormente, los cerebros fueron removidos del cráneo y almacenados en solución de sacarosa al 30% por una semana. Finalmente, se obtuvieron rebanadas cerebrales de 30 μ m para determinar el sitio de implante de las cánulas bilaterales.

5.3.5. Análisis estadístico

El porcentaje de ratas macho C y NC que montó, intromitió y eyaculó en los diferentes tratamientos hormonales fueron comparados con la prueba estadística Chi cuadrada y las diferencias entre grupos fue determinada con la prueba estadística de Fisher. Todas las pruebas estadísticas empleadas fueron llevadas a cabo con el paquete estadístico SigmaPlot para Windows versión 11.0 (Build 11.2.0.5 Systat Software, San Jose, CA).

5.4.6. Resultados

5.4.6.1. Efecto del implante intracerebral de T o E₂ a ratas macho C castrados o NC

Se emplearon un total de 73 ratas macho C y 14 ratas macho NC. Un grupo de 8 machos C permaneció gonadalmente intacto con cánulas vacías dirigidas al APM. El resto de las ratas macho fueron castrados y tratados hormonalmente como se indica en la tabla 4. El número de ratas macho con la cánula localizada dentro o fuera del sitio de interés se muestran en las tablas 5 y 6, respectivamente. La localización cerebral de las cánulas se muestra en la figura 7. Los machos C castrados con cánulas vacías dirigidas al APM o al NVMH o a la AMGm formaron un solo grupo (Cas CV). Este grupo, se repite en las figuras 8 a 11 con la finalidad de compararlo con los otros grupos y está compuesto como se indica en la tabla 5.

Tabla 4. Número de ratas macho C castrados o NC empleados en cada grupo experimental.

Machos	APM			NVMH			AMGm		
	T	E ₂	CV	T	E ₂	CV	T	E ₂	CV
C	15	12	7	10	4	2	7	6	2
NC	5	6	3	NP	NP	NP	NP	NP	NP

NP: no probado

Tabla 5. Número de ratas macho C castrados o NC con la cánula en el área cerebral de interés.

Machos	APM			NVMH			AMGm		
	T	E ₂	CV	T	E ₂	CV	T	E ₂	CV
C	9	9	7	7	4	2	5	4	2
NC	5	6	3	NP	NP	NP	NP	NP	NP

NP: no probado

Tabla 6. Número de ratas macho C castrados o NC con la cánula fuera del área cerebral de interés.

Machos	APM		NVMH		AMGm	
	T	E ₂	T	E ₂	T	E ₂
C	6	3	3	0	2	2
NC	0	0	NP	NP	NP	NP

NP: no probado

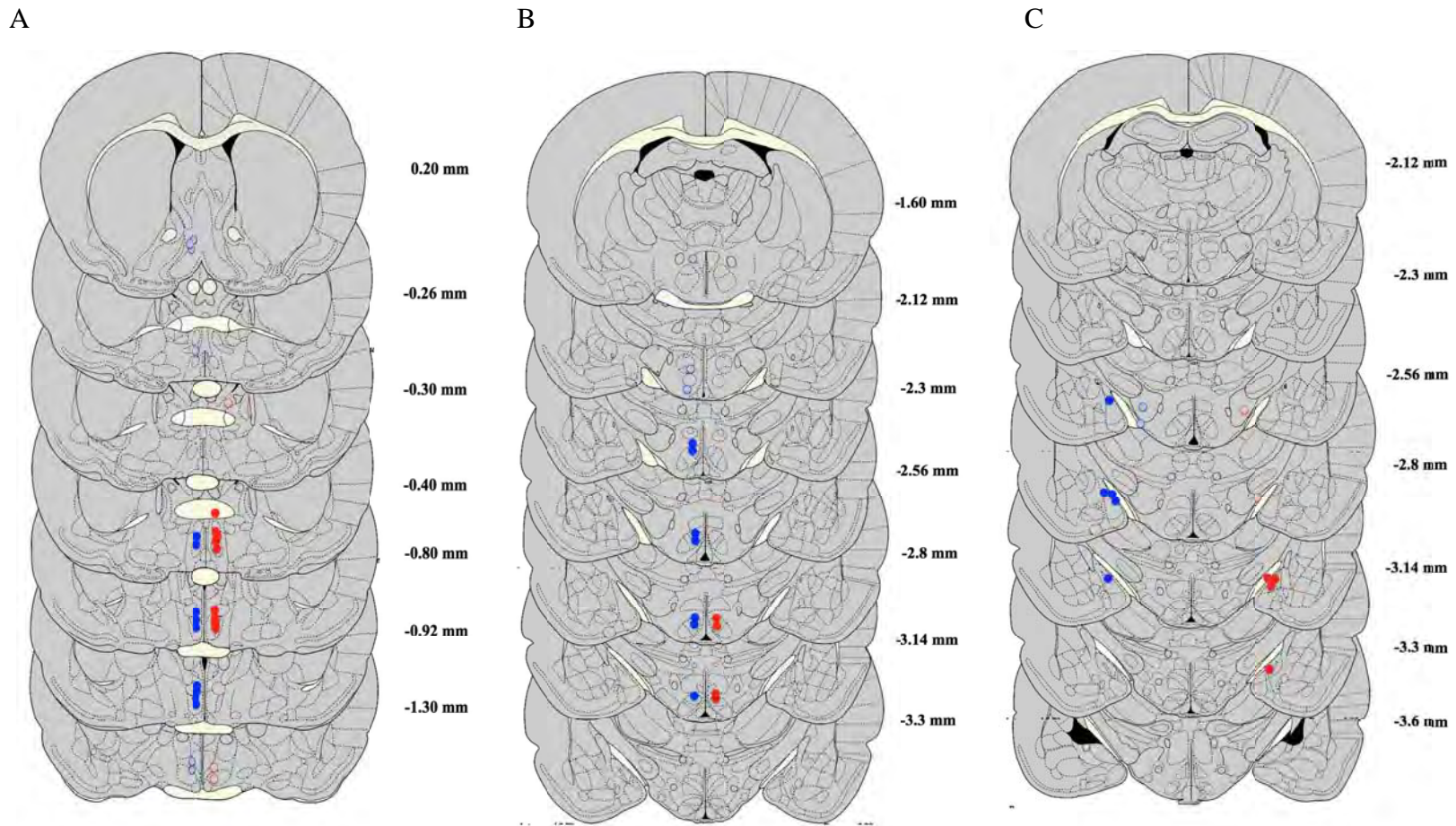


Figura 7. Localización de las cánulas con T (círculos azules) o E₂ (círculos rojos) dirigidas al APM (A) o al NVMH (B) o a la AMGm (C) de ratas machos C castrados. Los círculos llenos fueron considerados como dentro del área de interés y los círculos vacíos como fuera del área de interés.

5.4.6.2. Efecto del implante de T o E₂ en el APM de ratas macho C

En el APM de las ratas macho C castrados se observó que 3 o 4 semanas después del implante de T o E₂, respectivamente, el porcentaje de machos que montan o intrometen fue significativamente mayor que en el grupo control. Mientras que, en el APM de machos C castrados, 5 semanas después del implante de T, pero no el de E₂ el porcentaje de machos que eyaculó fue significativamente mayor que el grupo control. En el APM de los machos C castrados, el implante de E₂ aumentó el porcentaje de machos que eyaculan, pero no se observaron diferencias significativas. El porcentaje de ratas macho C castrados con implantes de T o E₂ en el APM que montaron, intromitieron o eyacularon disminuyó cinco meses después del implante. No observamos cambios significativos en el porcentaje de ratas macho C intactos con implantes bilaterales de cánulas vacías que montaron, intromitieron y eyacularon durante el periodo de observación (figura 8).

APM

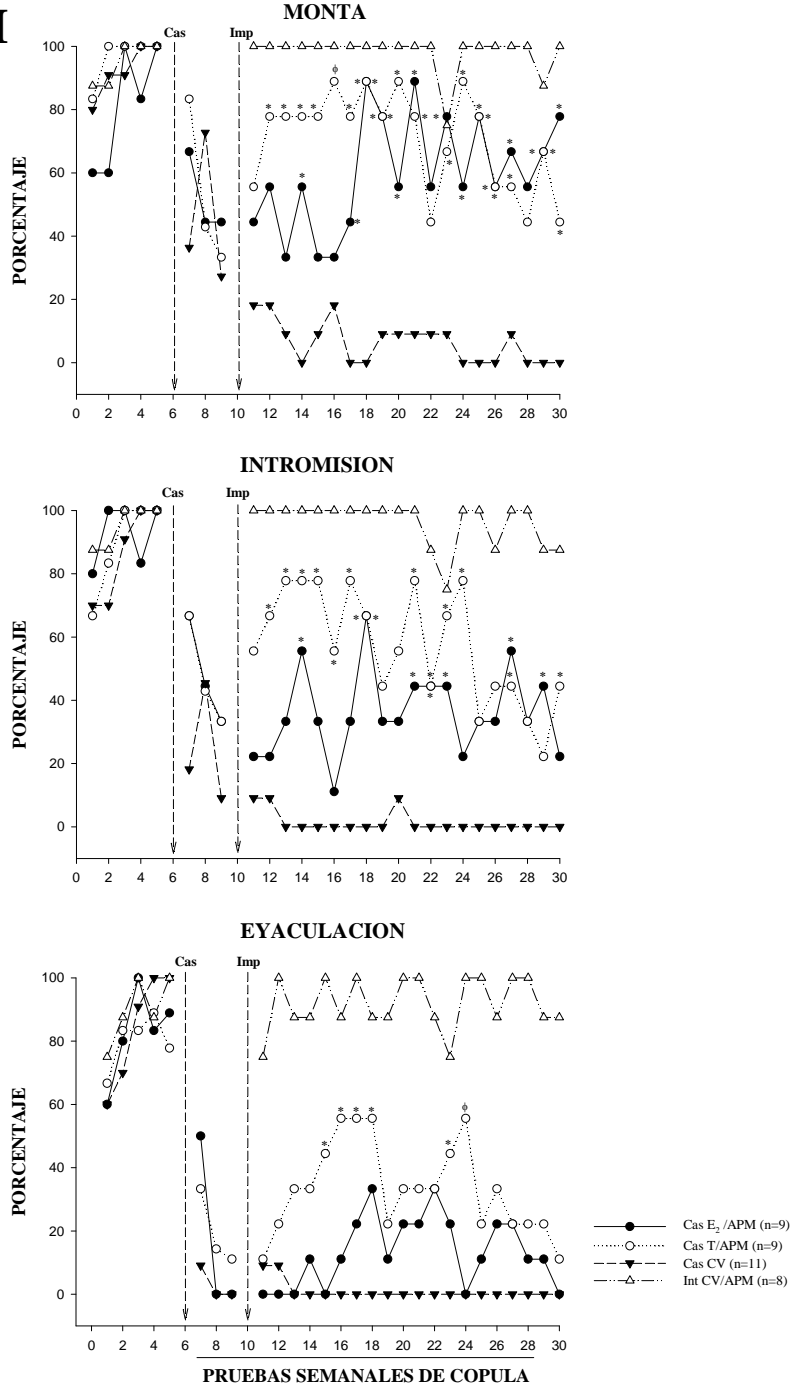


Figura 8. Porcentaje de ratas macho C castrados que montan, intromiten o eyaculan antes y después del implante hormonal. Implante bilateral de E₂ (Cas E₂/APM) o T (Cas T/APM) en el APM de ratas macho C castrados. Implante bilateral de cánulas vacías en el APM o en el NVMH o en la AMGm de ratas macho C castrados (Cas CV). Implante bilateral de cánula en el APM de ratas macho C no castrados (Int CV/APM). Cas: castración. Imp: implante. * diferente de Cas CV: p<0.05; φ diferente de todos: p<0.05.

5.4.6.3. Efecto del implante de T o E₂ en el NVMH de ratas macho C

En el NVMH de ratas macho C castrados, el implante de T, pero no el de E₂ induce la cópula. Es decir, el porcentaje de ratas macho C castrados con T en el NVMH que montan, intromiten, pero no los que eyaculan fue significativamente mayor que el grupo control 3 semanas después del implante. De todas las ratas macho C castrados con T en el NVMH montó, el 70% intromitió y el 14% eyaculó 4 semanas después del implante. El porcentaje de ratas macho C castrados con T en el NVMH que montó o intromitió disminuyó una semana más tarde. A los 5 meses después del implante de T en el NVMH de los machos C castrados, menos del 40% montó, menos del 20% intromitió y ninguno eyaculó. Dos machos C castrados con E₂ en el NVMH mostraron montas y uno mostró intromisiones en las pruebas semanales de cópula 18 (2 meses post-implante), 22 (3 meses post-implante) y 26 (4 meses post-implante) (figura 9).

NVMH

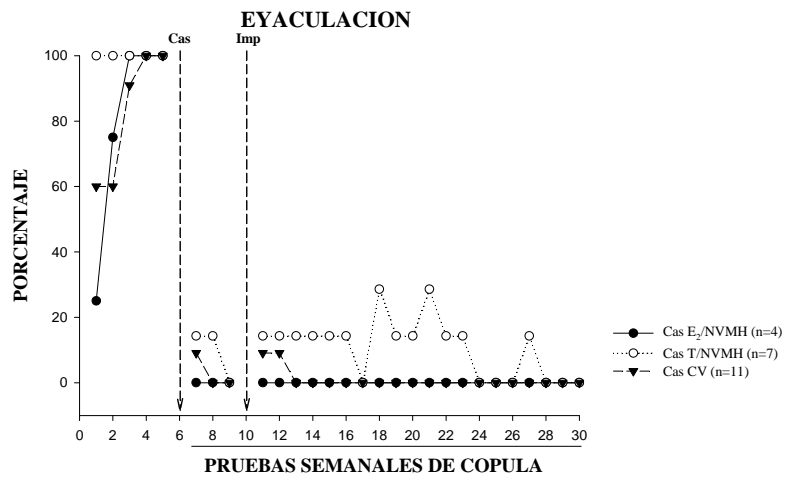
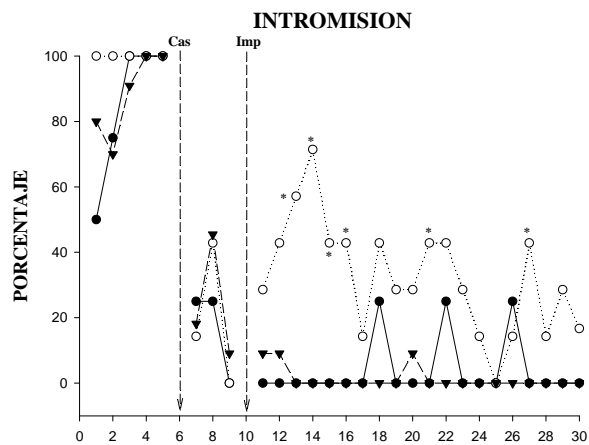
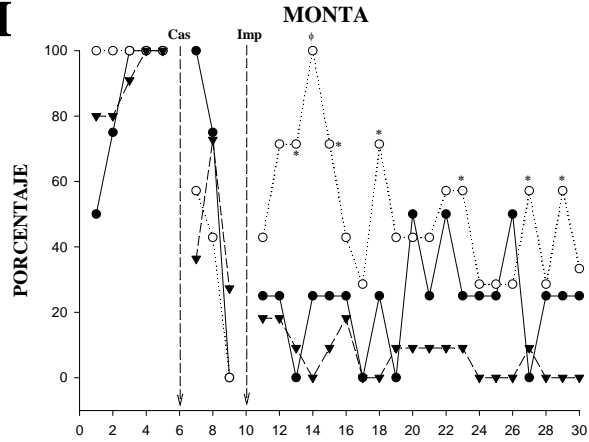


Figura 9. Porcentaje de ratas macho C castrados que montan, intromiten o eyaculan antes y después del implante hormonal. Implante bilateral de E₂ (Cas E₂/NVMH) o T (Cas T/NVMH) en el NVMH de ratas macho C castrados. Implante bilateral de cánula vacía en el APM o en el NVMH o en la AMGm de ratas macho C castrados (Cas CV). Cas: castración. Imp: implante. * diferente de Cas CV: p<0.05; φ diferente de todos: p<0.05.

5.4.6.4. Efecto del implante de T o E₂ en la AMGm de ratas macho C

En la AMGm de ratas macho C castrados, el implante de T induce montas, intromisiones y eyaculación; mientras que, el implante de E₂ induce montas e intromisiones, pero no la eyaculación. Estos es, el porcentaje de ratas macho C castrados con T en la AMGm que montó, intromitió y eyaculó fue significativamente mayor que el control en la prueba semanal de cópula número 15. El porcentaje de ratas macho C castrados con T en la AMGm que montó, intromitió o eyaculó disminuyó una semana más tarde. Menos del 20% de los machos montó y ninguno intromitió o eyaculó al final del periodo de observación. En cambio, el porcentaje de machos C castrados con E₂ en la AMGm que montó fue significativamente mayor que el control en la mayoría de las pruebas conductuales post-implante. Mientras que, el porcentaje de machos C castrados con E₂ en la AMGm que intrometió fue significativamente mayor que el control en las pruebas semanales de cópula 17, 20 y 24. Más del 70% y 50% de los machos C castrados con E₂ en la AMGm montó o intromitió al final del periodo de observación (figura 10).

AMGm

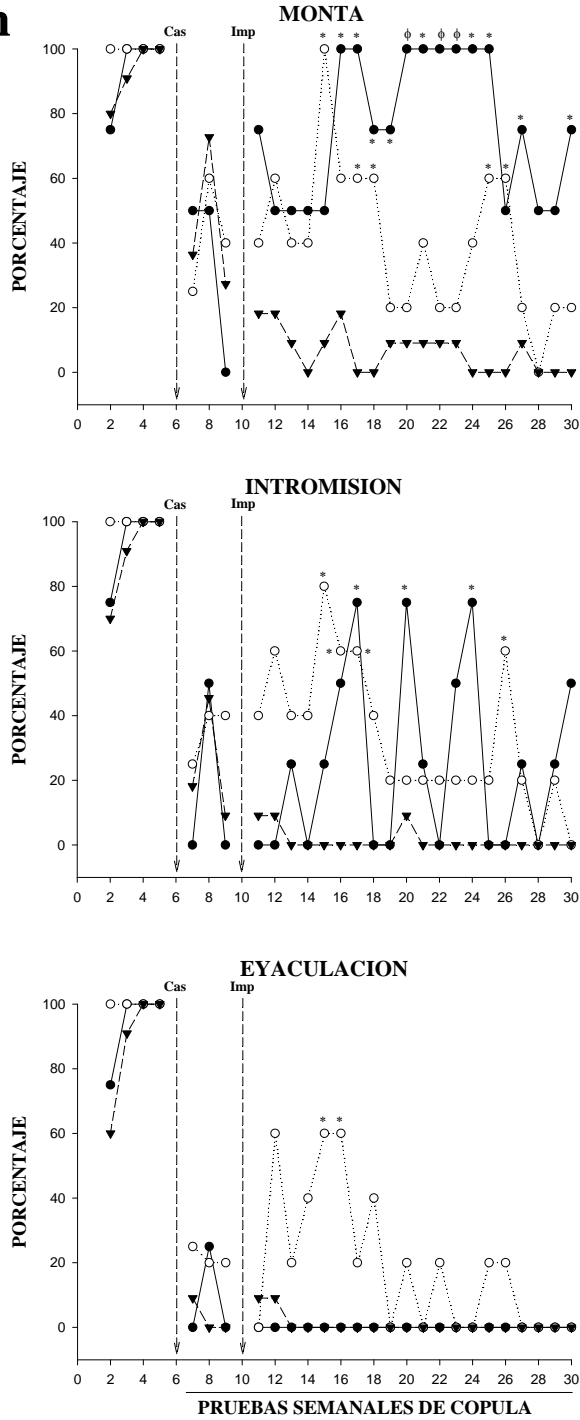


Figura 10. Porcentaje de ratas macho C castrados que montan, intromiten o eyaculan antes y después del implante hormonal. Implante bilateral de E₂ (Cas E₂/AMGM) o T (Cas T/AMGM) en el AMGm de ratas macho C castrados. Implante bilateral de cánula vacía en el APM o en el NVMH o en la AMGm de ratas macho C castrados (Cas CV). Cas: castración. Imp: implante. * diferente de Cas CV: p<0.05; φ diferente de todos: p<0.05.

5.4.6.5. Efecto del implante de T o E₂ fuera del APM o del NVMH o de la AMGm de ratas macho C castrados

Los implantes de T o E₂ fuera del APM o del NVMH o de la AMGm de ratas macho C castrados induce montas e intromisiones, pero no la eyaculación. Por ejemplo, el porcentaje de ratas macho C castrados tratados con E₂, pero no con T que montó fue significativamente mayor que el grupo control en las pruebas semanales de cópula 23 al 30. En cambio, el porcentaje de ratas macho C castrados con implantes de T, pero no de E₂ que montó fue significativamente mayor que el grupo control en la prueba semanal de cópula 15, 17 y 18. El porcentaje de machos C castrados con T o E₂ que intromitió fue significativamente mayor que el control en las pruebas semanal de cópula 22 y 26, respectivamente. Sólo 2 machos con T y 1 con E₂ fuera del APM o del NVMH o de la AMGm mostraron eyaculaciones de forma inconsistente a lo largo del periodo de observación (figura 11).

FUERA

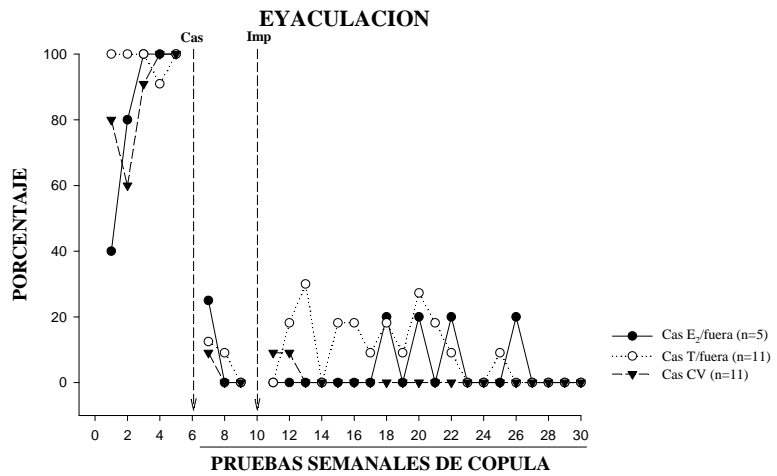
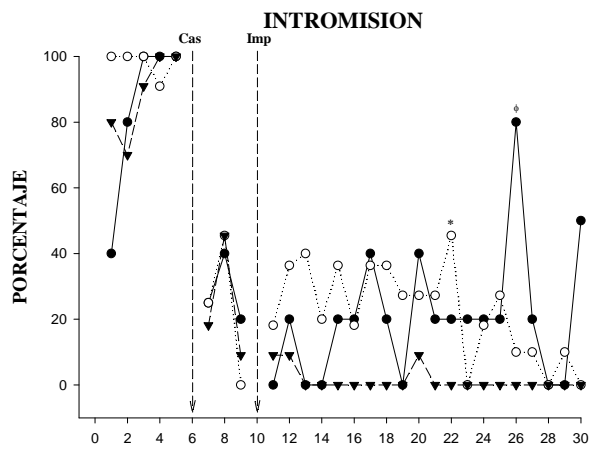
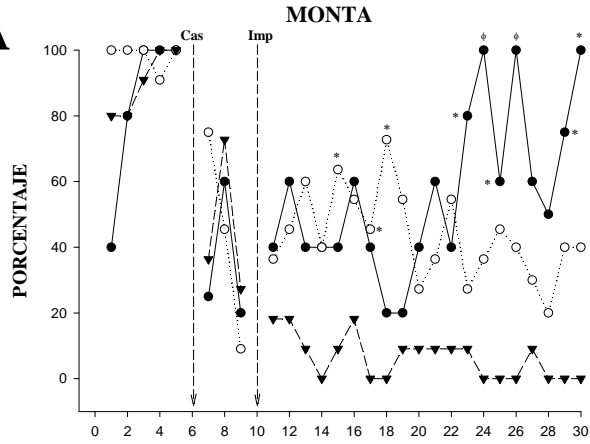


Figura 11. Porcentaje de ratas macho C castrados que montan, intromiten o eyaculan antes y después del implante hormonal. Implante bilateral de E_2 (Cas E_2 /fuera) o T (Cas T/fuera) fuera del APM o del NVMH o de la AMGm de ratas macho C castrados. Implante bilateral de cánula vacía en el AMP o en el NVMH o en la AMGm de ratas macho C castrados (Cas CV). Cas: castración. Imp: implante. * diferente de Cas CV: $p < 0.05$; ϕ diferente de todos: $p < 0.05$.

Los datos arriba descritos demuestran claramente que el implante de T o E_2 en el APM es el sitio más eficiente para inducir conducta sexual en ratas macho C castrados. Por ejemplo, en el APM de las ratas macho C castrados, el porcentaje de machos que eyacularon fue significativamente mayor en un tiempo más prolongado que el implante de T en la AMGm. Con base en estos resultados, se decidió que en el APM de los machos NC se implantaría bilateralmente una cánula guía con T o E_2 o vacía.

5.4.6.6. Efecto del implante de T o E_2 en el APM de ratas macho NC

Con la finalidad de mantener las mismas condiciones experimentales que en los machos C castrados, un primer grupo de 4 ratas macho NC fueron castrados y posteriormente recibieron en el APM, implantes bilaterales de cánulas con E_2 . Observamos que uno de los macho NC castrados montó e intromitió en la prueba semanal de cópula 1 al 15 y eyaculó en la prueba 2. El segundo macho NC castrado con E_2 en el APM desplegó montas e intromisiones, pero no eyaculó en las pruebas semanales de cópula 1, 2 y 4 después del implante. El tercer macho NC castrado con E_2 en el APM, sólo desplegó montas en la semana 3 después del implante. El cuarto macho NC castrado y tratado con E_2 no desplegó conducta sexual a lo largo de 15 semanas de observación. Estos resultados sugieren que en el APM de las ratas macho NC castrados, el implante de E_2 fue menos eficaz en la inducción de la conducta de cópula que en los machos C castrados. Con base en estos resultados, decidimos implantar T o E_2 en el APM de los macho NC gonadalmente intactos. Los resultados se muestran a continuación.

La figura 12 muestra el sitio de implante de las cánulas dirigidas al APM de las ratas machos NC.

Los datos del presente estudio muestran que en el APM de las ratas macho NC, el implante de T o E_2 induce conducta sexual. Observamos que el porcentaje de ratas macho NC con T o E_2 en el APM que montó e intromitió aumentó una semana después del implante. Mientras que, el porcentaje de ratas macho NC con T o E_2 en el APM que eyaculó aumentó dos semanas después del implante. Todos los machos NC con T o E_2 en el APM eyacularon

tres o cuatro meses después del implante, respectivamente (figura 13). Más aún, observamos que todas las ratas macho NC con T o E₂ en el APM desplegaron conducta eyaculatoria cinco meses después del implante hormonal. Con base en estos resultados, 4 ratas macho NC con E₂ y 2 con T en el APM continuaron las pruebas de conducta sexual más allá de los cinco meses después del implante hormonal. El porcentaje de ratas macho NC con E₂ en el APM disminuye 7 meses después del implante hormonal. Mientras que, las dos ratas macho NC con T en el APM, mostraron conducta eyaculatoria, al menos, 7 meses después del implante hormonal.

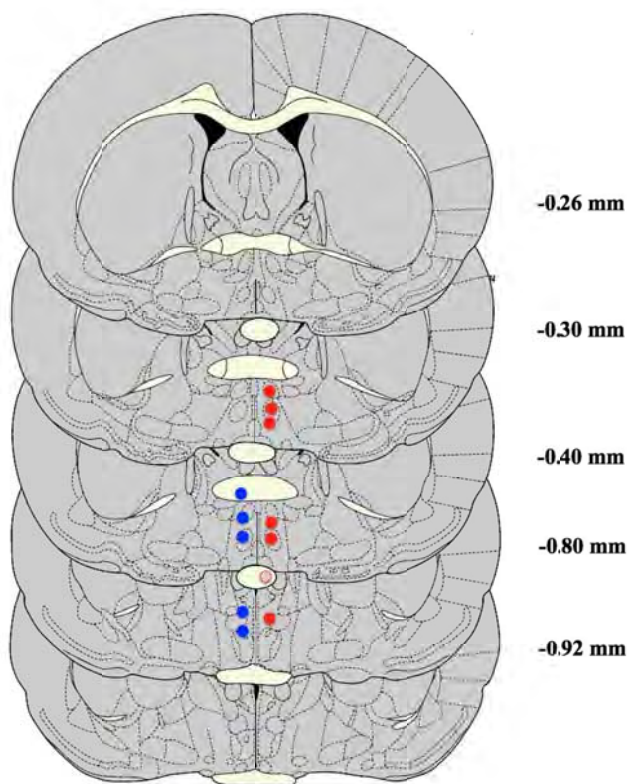


Figura 12. Localización de las cánulas con T (círculos azules) o E₂ (círculos rojos) dirigidas al APM de ratas machos NC. Los círculos llenos fueron considerados como dentro del APM y los círculos vacíos como fuera del APM.

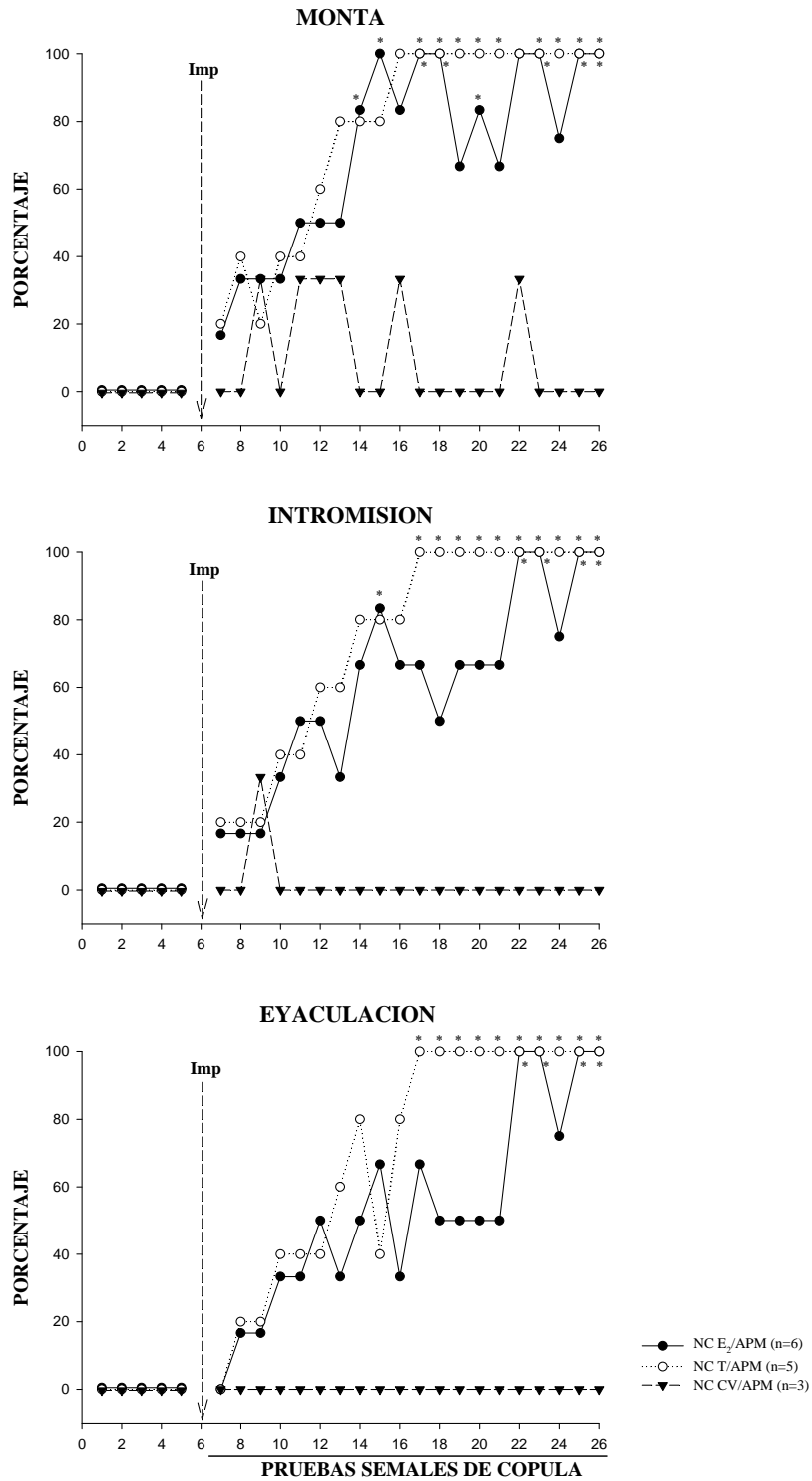


Figura 13. Porcentaje de ratas macho NC que montan, intromiten o eyaculan antes y después del implante bilateral de E₂ (NC E₂/APM) o T (NC T/APM) en el APM de ratas macho NC. Implante bilateral de cánula vacía en el APM de ratas macho NC (NC CV/APM). Imp: implante. * diferente del NC CV/APM: p<0.05.

Dos ratas macho NC que desplegaron conducta eyaculatoria con el implante de T o E₂ en el APM fueron apareados con dos hembras que mostraron ciclos estrales naturales. La receptividad sexual de las hembras fue determinada con un macho SE. Los machos NC fueron capaces de preñar a las hembras ciclantes. Cada hembra preñada parió camadas de 12 y 14 crías, respectivamente. En la edad adulta, las ratas macho de la generación F1, F2 y F5 de las ratas macho NC mostraron conducta copulatoria con hembras GDX sexualmente receptivas. Los parámetros de la cópula se muestran en el apéndice A.

5.4.7. Discusión

5.4.7.1. *Ratas macho copuladores*

El objetivo de este estudio fue determinar la efectividad del implante de T o E₂ en el APM o en el NVMH o en la AMGm de ratas macho C castrados sobre la conducta de cópula. Los datos del presente estudio muestran que en el APM de ratas macho C castrados, el implante bilateral de T o E₂ induce montas, intromisiones y eyaculaciones. Esto es, el porcentaje de ratas macho con T o E₂ en el APM que montan e intromiten fue significativamente mayor que los machos C castrados con cánulas vacías (control). En cambio, el porcentaje de ratas macho C castrados con T, pero no con E₂ en el APM que eyaculó fue significativamente mayor que los machos control. En el NVMH de ratas macho C castrados, el implante de T induce montas e intromisiones, pero no la eyaculación. Mientras que el implante de E₂ induce montas en dos machos e intromisiones en uno. Ninguno de los machos C castrados con el implante de E₂ eyaculó. En la AMGm de ratas macho C castrados, el implante de T induce montas, intromisiones y eyaculación. Mientras que el implante de E₂ induce montas e intromisiones, pero no la eyaculación. Estos resultados sugieren que la T y el E₂ modulan la conducta sexual masculina dependiendo del área cerebral.

Los resultados del presente estudio concuerdan con estudios clásicos en los que se ha observado que el APM de ratas macho está involucrado en la regulación hormonal de la conducta sexual (Christensen y Clemens, 1974; Johnston y Davidson, 1972; Lisk, 1967). Es decir, observamos que en el APM de ratas macho C castrados, el implante bilateral de T induce montas, intromisiones y eyaculaciones de manera significativa. Distinto a Christensen y Clemens (1974), observamos que en el APM de ratas macho C castrados, el implante bilateral de E₂ induce montas e intromisiones, pero no la eyaculación. Es probable que las diferencias entre el estudio de Christensen y Clemens (1974) y los resultados del presente estudio se deban a la disponibilidad de E₂ implantado en el APM de los machos C castrados. En el estudio de Christensen y Clemens (1974) cada rata macho C castrado recibió 15 ± 1 μg de E₂ en cada cánula en los días 0, 3, 6, 9 y 12 después del implante de la cánula (140-180 μg totales de hormona), lo que sugiere una mayor disponibilidad de E₂

local en comparación con el método de implante del presente trabajo (implante único de 300 ± 50 μg de la hormona). Por otro lado, se ha observado que en el APM de ratas macho C castrados tratados subcutáneamente con 5α -DHT, el implante de E_2 induce conducta eyaculatoria en 25 de 42 de estos machos en, al menos, 40% de las pruebas post-implante (Davis y Barfield, 1979). Estos resultados sugieren que la modulación de la conducta sexual masculina del APM depende de la acción androgénica y estrogénica.

En el presente estudio observamos que en el NVMH de las ratas macho C castrados, el implante de T, pero no de E_2 induce conductas de montas e intromisiones, pero no de eyaculaciones. Estudios previos han mostrado que, al igual que aquellos machos tratados con T, el implante de PT restaura la preferencia de pareja, pero no la conducta de cópula (Harding y McGinnis, 2003). Más aún, se ha observado que la T ejerce su efecto a través del RA. Es decir, en el NVMH de ratas macho C castrados, tratados con T, el implante de OHF inhibe la restauración de la preferencia de pareja y la preferencia de lugar condicionada (Harding y McGinnis, 2004). Es probable que las diferencias entre el presente estudio y el de Harding y McGinnis (2003) se deban al periodo de observación. Nosotros observamos que el porcentaje de ratas macho C castrados que montan e intromiten aumenta una semana después del implante de T en el NVMH y resulta estadísticamente significativo 3 semanas después del implante. En todo caso, estos resultados sugieren que en el NVMH, la modulación del componente motivacional de la conducta sexual masculina depende de andrógenos.

También observamos que en la AMGm de ratas macho, la expresión de la conducta sexual depende de las hormonas androgénicas y estrogénicas. Es decir, observamos que en la AMGm de las ratas macho C castrados, el implante de T aumentó, al menos parcial y temporalmente, el porcentaje de machos que montaron, intromitieron y eyacularon. En cambio, el implante de E_2 aumento significativamente el porcentaje de machos que montan e intromiten, pero no el de eyaculación. Estos resultados concuerdan con estudios previos. Por ejemplo, en la AMGm de ratas macho C castrados, el implante bilateral de T o 5α -DHT mantiene la conducta copulatoria y las erecciones sin contacto (Bialy y Sachs, 2002).

Además, en la AMGm de machos C castrados, tratados sistémicamente con E₂, el implante de 5 α -DHT induce conducta copulatoria (Baum et al., 1982).

En general, los resultados del presente estudio y de estudios clásicos sugieren que el APM, modula los aspectos motivacionales y de ejecución de la conducta sexual dependiente de T y E₂.

5.4.7.2. Ratas macho no copuladores

Los resultados del presente trabajo muestra que en el APM de las ratas macho NC, el implante de T o E₂ estimula la conducta de cópula. En resumen, observamos que en el APM de los machos NC una semana después del implante de T o E₂ el 20 y 16%, respectivamente, de estos machos montan e intromiten, pero no eyaculan. Mientras que, 3 o 4 meses después del implante de T o E₂ en el APM, respectivamente, todos los machos NC montan, intromiten y eyaculan. Más aún, observamos que cinco meses después del implante de T o E₂, todos los machos NC continuaron desplegando montas, intromisiones y eyaculaciones. Esto quiere decir, que el implante de T o E₂ en el APM de los machos NC estimula la cópula de forma gradual. Además, observamos que la T es más eficaz que el E₂ en estimular la cópula. Estos resultados sugieren que en el APM de los machos NC existe una alteración de acción hormonal sobre los circuitos neuronales asociado a la falta de cópula.

Es probable que la alteración asociada a la falta de cópula, característica de las ratas machos NC, involucre deficiencias en la interacción hormona-receptor o en el metabolismo de las hormonas. La primera posibilidad supone que en el APM de las ratas macho NC el RA y/o el RE α presenten una alteración estructural o conformacional que lleve a una regulación de la expresión de genes alterada que incluya, pero no se limite a, una sobre-expresión del RA y una sub-expresión del RE α como hemos demostrado en un estudio previo (Portillo et al., 2006a). La segunda posibilidad sugiere que en el APM de las ratas macho NC los niveles hormonales locales estén alterados. Previamente, hemos demostrado que en el APM de las ratas macho NC la actividad de la enzima P450arom es menor en

comparación con lo observado en los macho C (Portillo et al., 2007) que en consecuencia conlleva a niveles bajos de E₂ local. El implante de E₂ en el APM de las ratas macho NC aumenta los niveles locales de E₂ suficiente y necesario para estimular la cópula. Pero, estos resultados no explican por qué el implante de T en el APM de las ratas macho NC también induce conducta sexual. De hecho, la T fue más efectiva que el E₂ para inducir conducta de cópula en estos machos. Una posible explicación es que el implante de T en el APM de las ratas macho NC aumente la actividad de la enzima aromatasa. Ha sido descrito que en el APM de ratas macho castrados, la administración de T aumenta la actividad de la enzima P450arom 133% más que los niveles previos a la cirugía (Roselli y Resko, 1984; 1993). Sería interesante determinar si en el APM de los macho NC la actividad de la enzima 5 α -reductasa esta alterada.

Una tercera posibilidad es que en el APM de las ratas macho NC los sistemas de neurotransmisión estén alterados. Por ejemplo, se ha observado que en la rata macho NC la administración de 400 mg/kg/día de *para*-clorofenilalanina (*p*CPA, inhibidor de la síntesis de serotonina) induce conducta copulatoria en casi todos los machos. Aunque, tres semanas después de la administración de *p*CPA el porcentaje de ratas macho NC que copularon disminuyó (Ginton, 1976). En un estudio más reciente se observó que en ratas macho NC, la administración ip de 0.3 mg/kg de anandamida (agonista de los receptores a canabinoides) induce conducta sexual en 50% de estos machos. Además, las ratas macho NC que copularon con el tratamiento de anandamida muestran conducta copulatoria 14 días después del tratamiento (Canseco-Alba y Rodriguez-Manzo, 2013). En nuestro laboratorio, observamos que en ratones macho NC, la administración ip de 1 mg/kg o 5 mg/kg de SKF38393 (agonista selectivo de los receptores D₁ de dopamina) induce conducta de montas e intromisiones, pero no eyaculaciones en el 20% de los machos (Portillo et al., 2013). En todos los casos, la estimulación de la conducta copulatoria en machos NC con agonistas a neurotransmisores fue parcial o temporal. Es probable que en el presente estudio, en el APM de las ratas macho NC, el implante de T o E₂ induce cambios plásticos que promueven la cópula. Por ejemplo, se ha descrito ampliamente que en el SNC de mamíferos la T o el E₂ inducen cambios plásticos tales como en la síntesis y secreción de neurotransmisores o neuropéptidos, cambios en el número o función de receptores,

modulación del volumen nuclear, morfología dendrítica, patrón de inervación y número de entradas sinápticas (revisado por Garcia-Segura et al., 1994). Por ejemplo, en el núcleo sexualmente dimórfico del APM de la rata macho adulto, el tamaño de los somas neuronales disminuye 28 días después de la castración (Dugger et al., 2008). En la AMGm de la rata macho adulto, el volumen regional y el tamaño del soma neuronal depende de andrógenos circulantes. Es decir, el volumen regional y el tamaño del soma neuronal disminuye después de la castración, pero el tratamiento con 5α -DHT o E_2 previenen este efecto (Cooke et al., 2003). Más aún, la conducta sexual y las vocalizaciones ultrasónicas, pero no la preferencia sexual o el marcaje con orina fue inhibido por implantes de anisomicina (inhibidor de la síntesis de proteínas) en el APM de ratas macho castrados tratados sistémicamente con T (McGinnis y Kahn, 1997). Estos hallazgos sugieren que en la rata macho, la expresión de la conducta sexual requiere de la síntesis de proteínas que a su vez es necesaria para procesos fisiológicos como la formación de conexiones sinápticas.

La noción de que la T o el E_2 en el APM de los machos NC inducen cambios plásticos es apoyada por estudios previos de nuestro laboratorio. En estos, hemos demostrado que el “kindling” (estimulación eléctrica breve y repetida) en el APM, pero no en la AMGm de los machos NC indujo conducta copulatoria en 7 de 9 machos (Paredes et al., 1990). De hecho, observamos que la conducta copulatoria desplegada por los macho NC con kindling fue similar a la conducta sexual desplegada por las ratas macho C sexualmente expertos (Paredes et al., 1990). En un estudio posterior demostramos que la inducción de la cópula en los machos NC con kindling intermedio (estimulación eléctrica hasta la aparición de clonus faciales más cabeceo) o completo (hasta la aparición de caídas) en el APM continúan copulando 8 meses después de la estimulación eléctrica (Portillo et al., 2003). Estos resultados sugieren que el mantenimiento de la cópula en los machos NC se debe a cambios plásticos permanentes inducidos por el kindling en el APM. Aunque estos estudios no determinan si los cambios plásticos se deben a modificaciones en la potenciación a largo plazo (Sutula y Steward, 1986); cambios estructurales asociado a un aumento en la sensibilidad sináptica como el crecimiento de ramificaciones dendríticas o axonales; formación de nuevas conexiones sinápticas; aumento en la neurogénesis o bien un conjunto de estas posibilidades (Li et al., 2002; Parent et al., 1998; Woldbye et al., 1996).

Nuestros resultados demuestran que el implante de T o E₂ en el APM de los machos NC estimula la conducta de cópula en todos los machos. Esto contrasta con lo que se observa al administrar sistémicamente altas dosis de T en machos NC. Whalen y colaboradores (1961) observaron que la administración sistémica de T a ratas macho NC castrados indujo montas e intromisiones, pero no la eyaculación solamente en 1 de 6 machos. Beach (1940) observó que en algunos machos NC intactos, la administración de grandes cantidades de T no induce conducta copulatoria. Es probable que las diferencias entre los estudios previos y el presente se deba al sujeto de estudio. En el presente trabajo consideramos que un macho NC es aquel que después de varias pruebas de cópula con una hembra sexualmente receptiva no monta, no intromite y tampoco eyacula. En cambio, Whalen et al. (1961) y Damassa et al. (1977) consideraron que las ratas macho NC son aquellos que no intromiten en pruebas preliminares de cópula con una hembra sexualmente receptiva, pero es probable que montaran. Nosotros y otros grupos de trabajo, hemos observado una proporción pequeña de ratas macho que montan, intromiten, pero que no eyaculan en varias pruebas de cópula con una hembra receptiva. Estos machos, conocidos como copuladores lentos (CL), se caracterizan por un inicio tardío de la cópula. Los machos CL toman más tiempo en iniciar la cópula, similar a los machos de Whalen et al. (1961). En el primer experimento del presente trabajo observamos que en los machos CL, el tratamiento con T no incrementa el porcentaje de machos que eyaculan, mientras que el tratamiento con E₂ lo disminuye (Antonio-Cabrera y Paredes, 2012), probablemente como resultado de un efecto inhibitorio sobre el eje hipotálamo-hipófisis-testículos que disminuye la síntesis de T. En todo caso, ni la T ni el E₂ son capaces de inducir cambios plásticos que promuevan la conducta de eyaculación en los machos CL.

Por otro lado, el hecho de que las ratas macho NC fueron capaces de preñar a hembras que muestran un ciclo estral normal sugiere que las ratas macho NC son fértiles. Además, observamos que las crías macho NC mostraron conducta de cópula con hembras sexualmente receptivas. Esto sugiere que la falta de cópula en los machos NC no está determinada genéticamente.

En conclusión, los resultados del presente trabajo sugieren que en el APM de las ratas machos NC existe una alteración hormonal asociado a la falta de cópula. Es probable que esta alteración involucre deficiencias, al menos parcialmente, en la interacción hormona-receptor que a su vez provoca una expresión diferencial de genes involucrados en la modulación de la conducta sexual. Otra posibilidad es que los machos NC tengan una deficiencia en el metabolismo de las hormonas que conlleva a una disfunción sináptica.

6. CONCLUSIONES GENERALES

En el presente trabajo observamos que en la rata macho CL, la administración sistémica de T no aumenta el porcentaje de machos CL que eyaculan; mientras que, la administración de E₂ lo reduce. En cambio, en el APM de las ratas macho NC, el implante de T o E₂ induce la conducta de cópula. Estos resultados sugieren, que la falta de eyaculación, característica de los machos CL, no se debe a una alteración androgénica o estrogénica; mientras que, en el APM de los machos NC existe una alteración hormonal asociado a la falta de cópula. Es decir, las deficiencias conductuales entre los machos CL y NC se deben a factores biológicos distintos.

Los resultados del presente estudio y de estudios previos en nuestro laboratorio sugieren que la falta de eyaculación en los machos CL involucra deficiencias en el componente de ejecución de la conducta sexual. Alternativamente, es probable que la deficiencia eyaculatoria en los machos CL se deba a alteraciones en los circuitos de recompensa. En cambio, en los machos NC es probable que la deficiencia copulatoria involucre alteraciones en los circuitos cerebrales implicados en la modulación del componente motivacional de la conducta sexual. Por ejemplo, en estudios previos, hemos demostrado que las ratas macho CL muestran una clara preferencia por interactuar con hembras sexualmente receptivas o por el olor de la cama de hembras en estro en comparación con el olor de una cama de hembras en anestro o limpia (Portillo et al., 2006b). En cambio, los machos NC no muestran preferencia por una hembra sexualmente receptiva en pruebas donde ellos pueden escuchar, ver y oler a una hembra en estro o un macho sexualmente activo, pero donde el contacto físico no es posible ya que los animales están separados por una malla de alambre. También, demostramos que los machos NC muestran una preferencia significativamente reducida a olores de una hembra en estro en comparación a los machos C (Portillo y Paredes, 2004).

En conjunto, los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que la conducta sexual masculina está modulada por otros factores biológicos además del sistema de hormonas

esteroides sexuales. Aun falta por descubrir cuáles son estos factores biológicos que están alterados en los machos CL y NC.

7. PERSPECTIVAS

Determinar en los machos CL si la falta de eyaculación está asociada a una deficiencia en el procesamiento de estímulos sensoriales o a una alteración en los sistemas de recompensa.

Determinar en el APM de las ratas macho NC, si la deficiencia de la actividad P450arom está asociada a niveles bajos de la enzima P450arom.

Analizar en el APM de los machos NC la actividad de la enzima 5 α -reductasa.

Analizar en los machos NC el tamaño de los núcleos sexualmente dimórficos.

8. REFERENCIAS

- Agmo, A., 1997. Male rat sexual behavior. *Brain Res Brain Res Protoc* 1, 203-209.
- 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., 2007. *Functional and Dysfunctional Sexual Behavior. A Synthesis of Neuroscience and Comparative Psychology*. London, UK: Academic Press.
- Alexander, B.M., Stellflug, J.N., Rose, J.D., Fitzgerald, J.A., Moss, G.E., 1999. Behavior and endocrine changes in high-performing, low-performing, and male-oriented domestic rams following exposure to rams and ewes in estrus when copulation is precluded. *J Anim Sci* 77, 1869-1874.
- Alheid, G., de Olmos, J., Beltramino, C., 1995. Extended amygdala and basal forebrain, en: Paxinos, G. (Ed.), *The Nervous System*. Academic Press, San Diego, pp. 492-578.
- Antonio-Cabrera, E., Paredes, R.G., 2012. Effects of chronic estradiol or testosterone treatment upon sexual behavior in sexually sluggish male rats. *Pharmacol Biochem Behav* 101, 336-341.
- Attila, M., Oksala, R., Agmo, A., 2010. Sexual incentive motivation in male rats requires both androgens and estrogens. *Horm Behav* 58, 341-351.
- Bakker, J., Honda, S., Harada, N., Balthazart, J., 2002. Sexual partner preference requires a functional aromatase (*cyp19*) gene in male mice. *Horm Behav* 42, 158-171.

Bakker, J., Honda, S., Harada, N., Balthazart, J., 2004. Restoration of male sexual behavior by adult exogenous estrogens in male aromatase knockout mice. *Horm Behav* 46, 1-10.

Barfield, R.J., Geyer, L.A., 1972. Sexual behavior: ultrasonic postejaculatory song of the male rat. *Science* 176, 1349-1350.

Barfield, R.J., Sachs, B.D., 1968. Sexual behavior: stimulation by painful electrical shock to skin in male rats. *Science* 161, 392-393.

Baum, M.J., 1979. A comparison of the effects of methyltrienolone (R 1881) and 5 alpha-dihydrotestosterone on sexual behavior of castrated male rats. *Horm Behav* 13, 165-174.

Baum, M.J., Everitt, B.J., 1992. Increased expression of c-fos in the medial preoptic area after mating in male rats: role of afferent inputs from the medial amygdala and midbrain central tegmental field. *Neuroscience* 50, 627-646.

Baum, M.J., Tobet, S.A., Starr, M.S., Bradshaw, W.G., 1982. Implantation of dihydrotestosterone propionate into the lateral septum or medial amygdala facilitates copulation in castrated male rats given estradiol systemically. *Horm Behav* 16, 208-223.

Baum, M.J., Vreeburg, J.T., 1973. Copulation in castrated male rats following combined treatment with estradiol and dihydrotestosterone. *Science* 182, 283-285.

Beach, F.A., 1940. Effects of cortical lesions upon the copulatory behavior of male rats. *J Comp Psychol (1921)* 29, 193-245.

Beyer, C., Morali, G., Naftolin, F., Larsson, K., Perez, p., 1976. Effect of some antiestrogens and aromatase inhibitors on androgen induced sexual behavior in castrated male rats. *Horm Behav* 7, 353-363.

Bialy, M., Sachs, B.D., 2002. Androgen implants in medial amygdala briefly maintain noncontact erection in castrated male rats. *Horm Behav* 42, 345-355.

Boden, A.G., Harris, M.C., Parkes, M.J., 2000. The preoptic area in the hypothalamus is the source of the additional respiratory drive at raised body temperature in anaesthetised rats. *Exp Physiol* 85, 527-537.

Bookout, A.L., Jeong, Y., Downes, M., Yu, R.T., Evans, R.M., Mangelsdorf, D.J., 2006. Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell* 126, 789-799.

Brand, T., Kroonen, J., Mos, J., Slob, A.K., 1991. Adult partner preference and sexual behavior of male rats affected by perinatal endocrine manipulations. *Horm Behav* 25, 323-341.

Brinkmann, A.O., 2001. Lessons to be learned from the androgen receptor. *Eur J Dermatol* 11, 301-303.

Burger, H.G., 2002. Androgen production in women. *Fertil Steril* 77 Suppl 4, S3-5.

Canseco-Alba, A., Rodriguez-Manzo, G., 2013. Anandamide transforms noncopulating rats into sexually active animals. *J Sex Med* 10, 686-693.

Canteras, N.S., Simerly, R.B., Swanson, L.W., 1995. Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *J Comp Neurol* 360, 213-245.

Carr, W.J., Loeb, L.S., Dissinger, M.L., 1965. Responses of Rats to Sex Odors. *J Comp Physiol Psychol* 59, 370-377.

Carson-Jurica, M.A., Schrader, W.T., O'Malley, B.W., 1990. Steroid receptor family: structure and functions. *Endocr Rev* 11, 201-220.

Christensen, L.W., Clemens, L.G., 1974. Intrahypothalamic implants of testosterone or estradiol and resumption of masculine sexual behavior in long-term castrated male rats. *Endocrinology* 95, 984-990.

Christensen, L.W., Nance, D.M., Gorski, R.A., 1977. Effects of hypothalamic and preoptic lesions on reproductive behavior in male rats. *Brain Res Bull* 2, 137-141.

Clancy, A.N., Coquelin, A., Macrides, F., Gorski, R.A., Noble, E.P., 1984. Sexual behavior and aggression in male mice: involvement of the vomeronasal system. *J Neurosci* 4, 2222-2229.

Clancy, A.N., Zumpe, D., Michael, R.P., 2000. Estrogen in the medial preoptic area of male rats facilitates copulatory behavior. *Horm Behav* 38, 86-93.

Clark, M.M., Galef, B.G., Jr., 2000. Why some male Mongolian gerbils may help at the nest: testosterone, asexuality and alloparenting. *Anim Behav* 59, 801-806.

Clemens, L.G., Gladue, B.A., Coniglio, L.P., 1978. Prenatal endogenous androgenic influences on masculine sexual behavior and genital morphology in male and female rats. *Horm Behav* 10, 40-53.

Cole, P.A., Robinson, C.H., 1988. Peroxide model reaction for placental aromatase. *J Am Chem Soc* 110, 1284-1285.

Cooke, B.M., Breedlove, S.M., Jordan, C.L., 2003. Both estrogen receptors and androgen receptors contribute to testosterone-induced changes in the morphology of the medial amygdala and sexual arousal in male rats. *Horm Behav* 43, 336-346.

Cooke, B.M., Tabibnia, G., Breedlove, S.M., 1999. A brain sexual dimorphism controlled by adult circulating androgens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7538-7540.

Craig, J.V., Casida, L.E., Chapman, A.B., 1954. Male Infertility Associated with Lack of Libido in the Rat. *Am Nat* 88, 365-372.

Curtis, J.T., Liu, Y., Wang, Z., 2001. Lesions of the vomeronasal organ disrupt mating-induced pair bonding in female prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Brain Res* 901, 167-174.

Dahlman-Wright, K., Cavailles, V., Fuqua, S.A., Jordan, V.C., Katzenellenbogen, J.A., Korach, K.S., Maggi, A., Muramatsu, M., Parker, M.G., Gustafsson, J.A., 2006. International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev* 58, 773-781.

Damassa, D.A., Smith, E.R., Tennent, B., Davidson, J.M., 1977. The relationship between circulating testosterone levels and male sexual behavior in rats. *Horm Behav* 8, 275-286.

Davidson, J.M., 1969. Effects of estrogen on the sexual behavior of male rats. *Endocrinology* 84, 1365-1372.

Davis, P.G., Barfield, R.J., 1979. Activation of masculine sexual behavior by intracranial estradiol benzoate implants in male rats. *Neuroendocrinology* 28, 217-227.

De Gasperin-Estrada, G.P., Camacho, F.J., Paredes, R.G., 2008. Olfactory discrimination and incentive value of non copulating and sexually sluggish male rats. *Physiol Behav* 93, 742-747.

de Olmos, J., 1972. The amygdaloid projection field in the rat as studied with the cupric-silver method, en: BE, E. (Ed.), *The Neurobiology of the Amygdala*. Plenum Press, New York, pp. 145-204.

Dewsbury, D.A., 1967. A Quantitative Description of Behavior of Rats during Copulation. *Behaviour* 29, 154-178.

Dewsbury, D.A., 1979. Description of sexual behavior in research on hormone-behavior interactions, en: Beyer, C. (Ed.), *Endocrine Control of Sexual Behavior*. Raven Press, New York.

Dominguez-Salazar, E., Portillo, W., Baum, M.J., Bakker, J., Paredes, R.G., 2002. Effect of prenatal androgen receptor antagonist or aromatase inhibitor on sexual behavior, partner preference and neuronal Fos responses to estrous female odors in the rat accessory olfactory system. *Physiol Behav* 75, 337-346.

Dugger, B.N., Morris, J.A., Jordan, C.L., Breedlove, S.M., 2008. Gonadal steroids regulate neural plasticity in the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area of adult male and female rats. *Neuroendocrinology* 88, 17-24.

Dulac, C., Wagner, S., 2006. Genetic analysis of brain circuits underlying pheromone signaling. *Annu Rev Genet* 40, 449-467.

Emery, D.E., Sachs, B.D., 1976. Copulatory behavior in male rats with lesions in the bed nucleus of the stria terminalis. *Physiol Behav* 17, 803-806.

Fernandez-Guasti, A., Arteaga-Lopez, P., Antonio-Cabrera, E., 2010. Copulation modifies AR and ERalpha mRNA expression in the male rat brain. *Physiol Behav* 101, 738-745.

Gans, E., 1959. The I.C.S.H.-content of serum of intact and gonadectomized rats and of rats treated with sex hormones. *Acta Endocrinol (Copenh)* 32, 373-383.

Garcia-Segura, L.M., 2008. Aromatase in the brain: not just for reproduction anymore. *J Neuroendocrinol* 20, 705-712.

Garcia-Segura, L.M., Chowen, J.A., Parducz, A., Naftolin, F., 1994. Gonadal hormones as promoters of structural synaptic plasticity: cellular mechanisms. *Prog Neurobiol* 44, 279-307.

Gelmann, E.P., 2002. Molecular biology of the androgen receptor. *J Clin Oncol* 20, 3001-3015.

Ginton, A., 1976. Copulation in noncopulators: effect of PCPA in male rats. *Pharmacol Biochem Behav* 4, 357-359.

Greco, B., Edwards, D.A., Michael, R.P., Clancy, A.N., 1998. Androgen receptors and estrogen receptors are colocalized in male rat hypothalamic and limbic neurons that express Fos immunoreactivity induced by mating. *Neuroendocrinology* 67, 18-28.

Harding, C.F., Feder, H.H., 1976. Relation between individual differences in sexual behavior and plasma testosterone levels in the guinea pig. *Endocrinology* 98, 1198-1205.

Harding, S.M., McGinnis, M.Y., 2003. Effects of testosterone in the VMN on copulation, partner preference, and vocalizations in male rats. *Horm Behav* 43, 327-335.

Harding, S.M., McGinnis, M.Y., 2004. Androgen receptor blockade in the MPOA or VMN: effects on male sociosexual behaviors. *Physiol Behav* 81, 671-680.

Harding, S.M., Velotta, J.P., 2011. Comparing the relative amount of testosterone required to restore sexual arousal, motivation, and performance in male rats. *Horm Behav* 59, 666-673.

Harris, V.S., Sachs, B.D., 1975. Copulatory behavior in male rats following amygdaloid lesions. *Brain Res* 86, 514-518.

Hasler, J.A., Estabrook, R., Murray, M., Pikuleva, I., Waterman, M., Capdevila, J., Holla, V., Helvig, C., Falck, J.R., Farrell, G., Kaminsky, L.S., Spivack, S.D., Boitier, E., Beaune, P., 1999. Human cytochromes P450. *Mol Aspects Med* 20, 1-137.

Heimer, L., Larsson, K., 1967. Impairment of mating behavior in male rats following lesions in the preoptic-anterior hypothalamic continuum. *Brain Research* 3, 248-263.

Heinlein, C.A., Chang, C., 2002. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev* 23, 175-200.

Honda, S., Harada, N., Ito, S., Takagi, Y., Maeda, S., 1998. Disruption of sexual behavior in male aromatase-deficient mice lacking exons 1 and 2 of the *cyp19* gene. *Biochem Biophys Res Commun* 252, 445-449.

Huang, P., Chandra, V., Rastinejad, F., 2010. Structural overview of the nuclear receptor superfamily: insights into physiology and therapeutics. *Annu Rev Physiol* 72, 247-272.

Hull, E., Wood, R., McKenna, K., 2006. Neurobiology of male sexual behavior, en: Neill, J. (Ed.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Academic Press, San diego, pp. 1729-1823.

Hurtazo, H.A., Paredes, R.G., 2005. Olfactory preference and Fos expression in the accessory olfactory system of male rats with bilateral lesions of the medial preoptic area/anterior hypothalamus. *Neuroscience* 135, 1035-1044.

Jakab, R.L., Horvath, T.L., Leranth, C., Harada, N., Naftolin, F., 1993. Aromatase immunoreactivity in the rat brain: gonadectomy-sensitive hypothalamic neurons and an unresponsive "limbic ring" of the lateral septum-bed nucleus-amygdala complex. *J Steroid Biochem Mol Biol* 44, 481-498.

Johnston, P., Davidson, J.M., 1972. Intracerebral androgens and sexual behavior in the male rat. *Horm Behav* 3, 345-357.

Kamat, A., Hinshelwood, M.M., Murry, B.A., Mendelson, C.R., 2002. Mechanisms in tissue-specific regulation of estrogen biosynthesis in humans. *Trends Endocrinol Metab* 13, 122-128.

Kohlert, J.G., Bloch, G.J., 1996. Hyperactivity in hyposexual male rats. *Physiol Behav* 59, 171-178.

Kondo, Y., Sudo, T., Tomihara, K., Sakuma, Y., 2003. Activation of accessory olfactory bulb neurons during copulatory behavior after deprivation of vomeronasal inputs in male rats. *Brain Res* 962, 232-236.

Larsson, K., 1956. *Conditioning and sexual behavior in the male albino rat*, by Knut Larsson: Almqvist och Wiksell.

Larsson, K., 1979. Features of the neuroendocrine regulation of masculine sexual behavior, in: Beyer, C. (Ed.), *Endocrine Control of Sexual Behavior*. Raven Press, New York.

Larsson, K., Sodersten, P., Beyer, C., 1973a. Induction of male sexual behaviour by oestradiol benzoate in combination with dihydrotestosterone. *J Endocrinol* 57, 563-564.

Larsson, K., Sodersten, P., Beyer, C., 1973b. Sexual behavior in male rats treated with estrogen in combination with dihydrotestosterone. *Horm Behav* 4, 289-299.

Lee, V.W., de Kretser, D.M., Hudson, B., Wang, C., 1975. Variations in serum FSH, LH and testosterone levels in male rats from birth to sexual maturity. *J Reprod Fertil* 42, 121-126.

Lephart, E.D., 1993. Brain 5alpha-reductase: cellular, enzymatic, and molecular perspectives and implications for biological function. *Mol Cell Neurosci* 4, 473-484.

Lephart, E.D., 1996. A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain Res Brain Res Rev* 22, 1-26.

Li, S., Reinprecht, I., Fahnestock, M., Racine, R.J., 2002. Activity-dependent changes in synaptophysin immunoreactivity in hippocampus, piriform cortex, and entorhinal cortex of the rat. *Neuroscience* 115, 1221-1229.

Liman, E.R., 1996. Pheromone transduction in the vomeronasal organ. *Curr Opin Neurobiol* 6, 487-493.

Lisk, R.D., 1967. Neural localization for androgen activation of copulatory behavior in the male rat. *Endocrinology* 80, 754-761.

Liu, Y.C., Salamone, J.D., Sachs, B.D., 1997. Lesions in medial preoptic area and bed nucleus of stria terminalis: differential effects on copulatory behavior and noncontact erection in male rats. *J Neurosci* 17, 5245-5253.

Lu, S.F., McKenna, S.E., Cologer-Clifford, A., Nau, E.A., Simon, N.G., 1998. Androgen receptor in mouse brain: sex differences and similarities in autoregulation. *Endocrinology* 139, 1594-1601.

Luttge, W.G., 1975. Effects of anti-estrogens on testosterone stimulated male sexual behavior and peripheral target tissues in the castrate male rat. *Physiol Behav* 14, 839-846.

Lynch, C.S., Story, A.J., 2000. Dihydrotestosterone and estrogen regulation of rat brain androgen-receptor immunoreactivity. *Physiol Behav* 69, 445-453.

Malsbury, C.W., 1971. Facilitation of male rat copulatory behavior by electrical stimulation of the medial preoptic area. *Physiol Behav* 7, 797-805.

Martinez-Marcos, A., 2009. On the organization of olfactory and vomeronasal cortices. *Prog Neurobiol* 87, 21-30.

Mathews, D., Donovan, K.M., Hollingsworth, E.M., Hutson, V.B., Overstreet, C.T., 1983. Permanent deficits in lordosis behavior in female rats with lesions of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Exp Neurol* 79, 714-719.

Matochik, J.A., Barfield, R.J., 1991. Hormonal control of precopulatory sebaceous scent marking and ultrasonic mating vocalizations in male rats. *Horm Behav* 25, 445-460.

McDonald, P., Beyer, C., Newton, F., Brien, B., Baker, R., Tan, H.S., Sampson, C., Kitching, P., Greenhill, R., Pritchard, D., 1970. Failure of 5alpha-dihydrotestosterone to initiate sexual behaviour in the castrated male rat. *Nature* 227, 964-965.

McEwan, I.J., 2009. Nuclear receptors: one big family. *Methods Mol Biol* 505, 3-18.

McEwan, I.J., Nardulli, A.M., 2009. Nuclear hormone receptor architecture - form and dynamics: The 2009 FASEB Summer Conference on Dynamic Structure of the Nuclear Hormone Receptors. *Nucl Recept Signal* 7, e011.

McGinnis, M.Y., Kahn, D.F., 1997. Inhibition of male sexual behavior by intracranial implants of the protein synthesis inhibitor anisomycin into the medial preoptic area of the rat. *Horm Behav* 31, 15-23.

McGinnis, M.Y., Mirth, M.C., 1986. Inhibition of cell nuclear androgen receptor binding and copulation in male rats by an antiandrogen, Sch 16423. *Neuroendocrinology* 43, 63-68.

McGinnis, M.Y., Montana, R.C., Lumia, A.R., 2002. Effects of hydroxyflutamide in the medial preoptic area or lateral septum on reproductive behaviors in male rats. *Brain Res Bull* 59, 227-234.

Meisel, R.L., 1983. Recovery of masculine copulatory behavior from lesions of the medial preoptic area: effects of age versus hormonal state. *Behav Neurosci* 97, 785-793.

Meredith, M., 1986. Vomeronasal organ removal before sexual experience impairs male hamster mating behavior. *Physiol Behav* 36, 737-743.

Mitra, S.W., Hoskin, E., Yudkovitz, J., Pear, L., Wilkinson, H.A., Hayashi, S., Pfaff, D.W., Ogawa, S., Rohrer, S.P., Schaeffer, J.M., McEwen, B.S., Alves, S.E., 2003. Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology* 144, 2055-2067.

Morali, G., Larsson, K., Beyer, C., 1977. Inhibition of testosterone-induced sexual behavior in the castrated male rat by aromatase blockers. *Horm Behav* 9, 203-213.

Murphy, M.R., Schneider, G.E., 1970. Olfactory bulb removal eliminates mating behavior in the male golden hamster. *Science* 167, 302-304.

Naftolin, F., Ryan, K.J., Davies, I.J., Reddy, V.V., Flores, F., Petro, Z., Kuhn, M., White, R.J., Takaoka, Y., Wolin, L., 1975. The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues. *Recent Prog Horm Res* 31, 295-319.

Newman, S.W., 1999. The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network. *Ann N Y Acad Sci* 877, 242-257.

Norman, A., Litwack, G., 1997. *Steroid Hormones: Chemistry, Biosynthesis, and Metabolism, Hormones*, 2 ed. Academic Press, San Diego, pp. 49-85.

Nyby, J., Matochik, J.A., Barfield, R.J., 1992. Intracranial androgenic and estrogenic stimulation of male-typical behaviors in house mice (*Mus domesticus*). *Horm Behav* 26, 24-45.

Ogawa, S., Lubahn, D.B., Korach, K.S., Pfaff, D.W., 1997. Behavioral effects of estrogen receptor gene disruption in male mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1476-1481.

Paisley, J.C., Huddleston, G.G., Carruth, L.L., Petrusis, A., Grober, M.S., Clancy, A.N., 2012. Sexual responses of the male rat medial preoptic area and medial amygdala to estrogen I: site specific suppression of estrogen receptor alpha. *Horm Behav* 62, 50-57.

Paredes, R., Haller, A.E., Manero, M.C., Alvarado, R., Agmo, A., 1990. Medial preoptic area kindling induces sexual behavior in sexually inactive male rats. *Brain Res* 515, 20-26.

Paredes, R.G., 2003. Medial preoptic area/anterior hypothalamus and sexual motivation. *Scand J Psychol* 44, 203-212.

Paredes, R.G., Baum, M.J., 1997. Role of the medial preoptic area/anterior hypothalamus in the control of masculine sexual behavior. *Annu Rev Sex Res* 8, 68-101.

Parent, J.M., Janumpalli, S., McNamara, J.O., Lowenstein, D.H., 1998. Increased dentate granule cell neurogenesis following amygdala kindling in the adult rat. *Neurosci Lett* 247, 9-12.

Pattij, T., de Jong, T.R., Uitterdijk, A., Waldinger, M.D., Veening, J.G., Cools, A.R., van der Graaf, P.H., Olivier, B., 2005. Individual differences in male rat ejaculatory behaviour: searching for models to study ejaculation disorders. *Eur J Neurosci* 22, 724-734.

Paxinos, G., Watson, C., 2005. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Fifth ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press.

Pfaff, D., 1970. Nature of sex hormone effects on rat sex behavior: specificity of effects and individual patterns of response. *J Comp Physiol Psychol* 73, 349-358.

Phoenix, C.H., Chambers, K.C., 1988. Testosterone therapy in young and old rhesus males that display low levels of sexual activity. *Physiol Behav* 43, 479-484.

Pi, X., Grattan, D.R., 1999. Expression of prolactin receptor mRNA is increased in the preoptic area of lactating rats. *Endocrine* 11, 91-98.

Portillo, W., Antonio-Cabrera, E., Camacho, F.J., Diaz, N.F., Paredes, R.G., 2013. Behavioral characterization of non-copulating male mice. *Horm Behav* 64, 70-80.

Portillo, W., Basanez, E., Paredes, R.G., 2003. Permanent changes in sexual behavior induced by medial preoptic area kindling-like stimulation. *Brain Res* 961, 10-14.

Portillo, W., Castillo, C.G., Retana-Marquez, S., Roselli, C.E., Paredes, R.G., 2007. Neuronal activity of aromatase enzyme in non-copulating male rats. *J Neuroendocrinol* 19, 139-141.

Portillo, W., Diaz, N.F., Cabrera, E.A., Fernandez-Guasti, A., Paredes, R.G., 2006a. Comparative analysis of immunoreactive cells for androgen receptors and oestrogen receptor alpha in copulating and non-copulating male rats. *J Neuroendocrinol* 18, 168-176.

Portillo, W., Diaz, N.F., Retana-Marquez, S., Paredes, R.G., 2006b. Olfactory, partner preference and Fos expression in the vomeronasal projection pathway of sexually sluggish male rats. *Physiol Behav* 88, 389-397.

Portillo, W., Paredes, R.G., 2003. Sexual and olfactory preference in noncopulating male rats. *Physiol Behav* 80, 155-162.

Portillo, W., Paredes, R.G., 2004. Sexual incentive motivation, olfactory preference, and activation of the vomeronasal projection pathway by sexually relevant cues in non-copulating and naive male rats. *Horm Behav* 46, 330-340.

Pottier, J.J., Baran, D., 1973. A general behavioral syndrome associated with persistent failure to mate in the male laboratory rat. *J Comp Physiol Psychol* 83, 499-509.

Powers, J.B., Newman, S.W., Bergondy, M.L., 1987. MPOA and BNST lesions in male Syrian hamsters: differential effects on copulatory and chemoinvestigatory behaviors. *Behav Brain Res* 23, 181-195.

Rasia-Filho, A.A., Peres, T.M., Cubilla-Gutierrez, F.H., Lucion, A.B., 1991. Effect of estradiol implanted in the corticomедial amygdala on the sexual behavior of castrated male rats. *Braz J Med Biol Res* 24, 1041-1049.

Robinson-Rechavi, M., Escrivá Garcia, H., Laudet, V., 2003. The nuclear receptor superfamily. *J Cell Sci* 116, 585-586.

Roselli, C.E., Cross, E., Poonyagariyagorn, H.K., Stadelman, H.L., 2003. Role of aromatization in anticipatory and consummatory aspects of sexual behavior in male rats. *Horm Behav* 44, 146-151.

Roselli, C.E., Ellinwood, W.E., Resko, J.A., 1984. Regulation of brain aromatase activity in rats. *Endocrinology* 114, 192-200.

Roselli, C.E., Resko, J.A., 1984. Androgens regulate brain aromatase activity in adult male rats through a receptor mechanism. *Endocrinology* 114, 2183-2189.

Roselli, C.E., Resko, J.A., 1987. The distribution and regulation of aromatase activity in the central nervous system. *Steroids* 50, 495-508.

Roselli, C.E., Resko, J.A., 1993. Aromatase activity in the rat brain: hormonal regulation and sex differences. *J Steroid Biochem Mol Biol* 44, 499-508.

Sah, P., Faber, E.S., Lopez De Armentia, M., Power, J., 2003. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev* 83, 803-834.

Sanderson, J.T., 2006. The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicol Sci* 94, 3-21.

Sato, T., Matsumoto, T., Kawano, H., Watanabe, T., Uematsu, Y., Sekine, K., Fukuda, T., Aihara, K., Krust, A., Yamada, T., Nakamichi, Y., Yamamoto, Y., Nakamura, T., Yoshimura, K., Yoshizawa, T., Metzger, D., Chambon, P., Kato, S., 2004. Brain masculinization requires androgen receptor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1673-1678.

Simental, J.A., Sar, M., Lane, M.V., French, F.S., Wilson, E.M., 1991. Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. *J Biol Chem* 266, 510-518.

Simerly, R.B., Chang, C., Muramatsu, M., Swanson, L.W., 1990. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 294, 76-95.

Simpson, E.R., Mahendroo, M.S., Means, G.D., Kilgore, M.W., Hinshelwood, M.M., Graham-Lorence, S., Amarneh, B., Ito, Y., Fisher, C.R., Michael, M.D., et al., 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev* 15, 342-355.

Snyder, P., 2001. Androgens, en: Harman, J., Limbird, L. (Eds.), *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10a ed. McGrawG-Hill, Nwe York, pp. 1635-1648.

Sodersten, P., 1973. Estrogen-activated sexual behavior in male rats. *Horm Behav* 4, 247-256.

Stack, E.C., Balakrishnan, R., Numan, M.J., Numan, M., 2002. A functional neuroanatomical investigation of the role of the medial preoptic area in neural circuits regulating maternal behavior. *Behav Brain Res* 131, 17-36.

Stefanick, M.L., Davidson, J.M., 1987. Genital responses in noncopulators and rats with lesions in the medial preoptic area or midthoracic spinal cord. *Physiol Behav* 41, 439-444.

Stone, C.P., 1938. Activation of impotent male rats by injections of testosterone propionate. *J Comp Psychol* (1921) 25, 445-450.

Sutula, T., Steward, O., 1986. Quantitative analysis of synaptic potentiation during kindling of the perforant path. *J Neurophysiol* 56, 732-746.

Thompson, E.A., Jr., Siiteri, P.K., 1974. The involvement of human placental microsomal cytochrome P-450 in aromatization. *J Biol Chem* 249, 5373-5378.

Toda, K., Okada, T., Takeda, K., Akira, S., Saibara, T., Shiraishi, M., Onishi, S., Shizuta, Y., 2001. Oestrogen at the neonatal stage is critical for the reproductive ability of male mice as revealed by supplementation with 17beta-oestradiol to aromatase gene (Cyp19) knockout mice. *J Endocrinol* 168, 455-463.

Vagell, M.E., McGinnis, M.Y., 1997. The role of aromatization in the restoration of male rat reproductive behavior. *J Neuroendocrinol* 9, 415-421.

Wersinger, S.R., Sannen, K., Villalba, C., Lubahn, D.B., Rissman, E.F., De Vries, G.J., 1997. Masculine sexual behavior is disrupted in male and female mice lacking a functional estrogen receptor alpha gene. *Horm Behav* 32, 176-183.

Whalen, R.E., Beach, F.A., Kuehn, R.E., 1961. Effects of exogenous androgen on sexually responsive and unresponsive male rats. *Endocrinology* 69, 373-380.

Winans, S.S., Powers, J.B., 1977. Olfactory and vomeronasal deafferentation of male hamsters: histological and behavioral analyses. *Brain Res* 126, 325-344.

Woldbye, D.P., Bolwig, T.G., Kragh, J., Jorgensen, O.S., 1996. Synaptic degeneration and remodelling after fast kindling of the olfactory bulb. *Neurochem Res* 21, 585-593.

Xia, J., Sellers, L.A., Oxley, D., Smith, T., Emson, P., Keverne, E.B., 2006. Urinary pheromones promote ERK/Akt phosphorylation, regeneration and survival of vomeronasal (V2R) neurons. *Eur J Neurosci* 24, 3333-3342.

Zhang, Z., Burch, P.E., Cooney, A.J., Lanz, R.B., Pereira, F.A., Wu, J., Gibbs, R.A., Weinstock, G., Wheeler, D.A., 2004. Genomic analysis of the nuclear receptor family: new insights into structure, regulation, and evolution from the rat genome. *Genome Res* 14, 580-590.

9. APENDICE

Parámetros copulatorios de ratas macho obtenidos por la cruce de ratas macho NC con ratas hembras que mostraron ciclos estrales naturales.

Tabla A1. Parámetros copulatorios de las ratas macho F1.

F1	LM (s)		LI (s)		LE (s)		NM		NI	
	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2
1	53	18	56	23	529	385	5	5	12	11
2	82	7	82	7	492	411	7	8	9	10
3	41	36	41	36	518	402	11	6	11	9
4	N	211	N	211	N	526	N	2	N	15
5	N	54	N	54	N	406	N	3	N	13
6	1745	29	1778	29	N	1435	1	17	2	22
7	42	59	42	59	N	551	24	5	20	20
8	13	NP	13	NP	437	NP	3	NP	12	NP
9	22	NP	39	NP	848	NP	6	NP	15	NP
10	34	NP	34	NP	591	NP	6	NP	13	NP
11	29	NP	92	NP	751	NP	14	NP	16	NP
12	180	NP	339	NP	528	NP	15	NP	5	NP

N: no mostró la conducta. NP: no probado. P: número de la prueba copulatoria. LM: latencia de monta.

LI: latencia de intromisión. LE: latencia de eyaculación. NM: número de montas. NI: número de intromisiones. (s): segundos.

Tabla A2. Parámetros copulatorios de las ratas macho F2.

F2	LM (s)				LI (s)				LE(s)				NM				NI			
	Macho	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3
1	19	NP	NP	NP	38	NP	NP	NP	466	NP	NP	NP	5	NP	NP	NP	12	NP	NP	NP
2	271	37	31	N	271	N	106	N	346	N	831	N	2	11	30	N	7	N	12	N
3	21	3	1	18	21	51	12	18	554	603	354	297	4	6	4	8	11	12	16	12
4	106	24	24	9	334	24	46	9	516	681	664	322	7	7	12	4	11	13	12	14
5	N	97	23	43	N	162	23	96	N	848	416	282	N	16	11	4	N	8	8	8
6	67	7	43	2	67	22	43	30	854	1073	767	450	7	28	16	3	16	20	13	18
7	65	1	1	1	65	1	1	1	745	521	787	222	6	8	12	6	15	16	21	9
8	37	17	2	5	37	912	2	13	N	N	490	223	24	13	3	2	15	1	14	9
9	98	43	48	23	150	43	48	51	976	795	431	N	19	28	14	8	11	9	5	12

N: no mostró la conducta. NP: no probado. P: número de la prueba copulatoria. LM: latencia de monta. LI: latencia de intromisión. LE: latencia de eyaculación. NM: número de montas. NI: número de intromisiones. (s): segundos.

Tabla A3. Parámetros copulatorios de las ratas macho F5.

F5	LM (S)				LI (s)				LE (s)				NM				NI			
	Macho	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3
1	N	37	225	12	N	37	252	12	N	599	789	228	N	1	8	1	N	10	19	9
2	1409	67	49	6	1409	230	52	6	N	1335	948	487	1	3	4	9	9	9	18	10
3	73	13	98	20	136	58	221	20	910	204	873	331	3	5	7	3	10	12	10	7
4	40	55	45	8	66	63	51	42	793	312	620	319	11	2	2	2	8	10	6	9
5	883	275	202	9	1207	1125	202	9	N	322	723	339	5	4	9	4	3	4	9	6
6	44	10	23	18	119	10	36	40	626	783	395	313	6	3	5	5	13	15	17	11
7	341	150	412	123	708	270	412	123	1031	1545	763	437	9	7	1	5	10	11	9	8
8	78	43	50	21	113	43	160	21	800	933	971	456	4	1	4	3	15	12	13	9
9	49	50	6	NP	49	50	21	NP	481	417	1043	NP	4	1	18	NP	10	10	16	NP
10	38	38	38	NP	38	38	115	NP	428	222	576	NP	2	1	5	NP	10	5	10	NP
11	70	47	51	NP	70	47	84	NP	317	162	326	NP	1	1	3	NP	7	6	11	NP
12	22	9	5	NP	22	9	5	NP	1147	1170	791	NP	9	6	9	NP	12	12	15	NP
13	308	44	72	NP	308	282	72	NP	527	1093	414	NP	14	21	5	NP	6	9	9	NP
14	35	17	24	NP	48	30	49	NP	236	230	134	NP	3	3	2	NP	7	7	6	NP
15	72	30	10	NP	81	30	10	NP	403	416	252	NP	4	4	4	NP	6	6	7	NP
16	88	10	10	NP	88	10	10	NP	797	700	195	NP	5	3	1	NP	11	16	8	NP
17	97	60	22	NP	97	60	22	NP	1022	1004	938	NP	16	1	9	NP	15	16	10	NP
18	167	30	9	NP	167	30	9	NP	452	507	249	NP	3	1	10	NP	11	16	11	NP
19	50	14	13	NP	50	14	13	NP	395	320	287	NP	8	1	1	NP	10	9	10	NP
20	16	138	33	NP	40	138	33	NP	495	271	259	NP	3	1	3	NP	13	6	9	NP

N: no mostró la conducta. NP: no probado. P: número de la prueba copulatoria. LM: latencia de monta. LI: latencia de intromisión. LE: latencia de eyaculación. NM: número de montas. NI: número de intromisiones. (S): segundos. Continúa en la siguiente página...

...viene de la página anterior. Tabla A3. Parámetros copulatorios de las ratas macho F5.

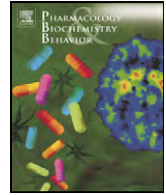
F5	LM (S)				LI (S)				LE (s)				NM				NI			
	Macho	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3
21	4	5	6	NP	4	5	6	NP	762	882	243	NP	23	6	2	NP	11	13	7	NP
22	93	40	159	NP	93	40	162	NP	635	660	779	NP	3	5	7	NP	14	9	8	NP
23	117	14	11	NP	117	42	25	NP	161	87	40	NP	2	1	2	NP	5	4	3	NP
24	21	20	NP	NP	21	277	NP	NP	243	526	NP	NP	1	18		NP	6	5	NP	NP
25	126	1	NP	NP	126	1	NP	NP	131	112	NP	NP	1	2		NP	3	5	NP	NP
26	N	216	5	NP	N	411	5	NP	N	819	512	NP	N	3	5	NP	N	13	9	NP
27	89	13	14	NP	89	13	14	NP	1217	627	619	NP	5	10	5	NP	13	8	9	NP
28	53	17	1	NP	160	20	6	NP	814	463	693	NP	6	5	17	NP	10	7	9	NP
29	50	15	4	NP	50	15	30	NP	1278	772	478	NP	3	6	6	NP	12	13	9	NP
30	71	13	26	NP	71	13	26	NP	614	472	418	NP	3	2	5	NP	7	9	9	NP
31	5	8	4	NP	5	8	4	NP	190	147	183	NP	3	3	8	NP	7	5	10	NP
32	46	8	10	NP	46	8	10	NP	468	353	150	NP	3	1	N	NP	6	7	4	NP
33	N	N	1110	NP	N	N	1110	NP	N	N	164	NP	N	N	N	NP	N	N	4	NP
34	259	20	506	NP	282	20	560	NP	783	868	1079	NP	2	11	11	NP	10	19	10	NP
35	71	15	5	NP	71	19	12	NP	437	930	361	NP	5	4	1	NP	9	16	8	NP
36	14	7	35	NP	14	13	35	NP	61	105	166	NP	1	4	1	NP	2	3	4	NP
37	89	4	7	NP	89	64	7	NP	215	386	53	NP	2	2	1	NP	8	9	5	NP
38	1	41	29	NP	1	41	70	NP	890	1108	498	NP	5	6	5	NP	13	15	9	NP
39	476	179	37	NP	476	304	40	NP	904	746	286	NP	2	5	1	NP	16	10	5	NP
40	N	576	NP	NP	N	576	NP	NP	N	1236	NP	NP	N	7	NP	NP	N	17	NP	NP

N: no mostró la conducta. NP: no probado. P: número de la prueba copulatoria. LM: latencia de monta. LI: latencia de intromisión. LE: latencia de eyaculación. NM: número de montas. NI: número de intromisiones. (s): segundos. Continua en la siguiente pagina...

...viene de la página anterior. Tabla A3. Parámetros copulatorios de las ratas macho F5.

F5 Macho	LM (s)				LI (s)				LE (s)				NM				NI			
	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4
41	765	508	NP	NP	N	508	NP	NP	N	904	NP	NP	10	6	NP	NP	N	10	NP	NP
42	173	38	NP	NP	651	38	NP	NP	N	352	NP	NP	4	3	NP	NP	12	14	NP	NP
43	29	48	NP	NP	29	137	NP	NP	569	454	NP	NP	11	7	NP	NP	9	14	NP	NP
44	245	20	NP	NP	245	20	NP	NP	1213	558	NP	NP	11	7	NP	NP	16	17	NP	NP
45	101	12	NP	NP	135	12	NP	NP	341	183	NP	NP	4	2	NP	NP	9	8	NP	NP
46	603	72	2	NP	844	106	2	NP	476	592	317	NP	6	3	3	NP	7	12	7	NP
47	229	89	2	NP	229	159	2	NP	671	643	349	NP	3	6	2	NP	11	13	8	NP
48	438	41	20	NP	520	71	20	NP	1140	612	883	NP	9	9	13	NP	20	14	19	NP
49	67	26	8	NP	67	26	8	NP	447	261	158	NP	1	1	N	NP	10	9	8	NP
50	147	277	55	NP	147	643	55	NP	490	477	421	NP	7	15	8	NP	8	6	7	NP
51	253	28	31	NP	253	28	31	NP	432	430	201	NP	4	4	3	NP	8	10	9	NP
52	310	58	9	NP	310	58	9	NP	302	715	501	NP	2	3	2	NP	7	11	13	NP
53	203	24	22	NP	203	24	22	NP	1109	873	870	NP	9	6	3	NP	14	15	14	NP
54	469	59	20	NP	469	59	20	NP	306	406	254	NP	1	1	5	NP	9	16	5	NP
55	73	84	16	NP	73	95	16	NP	793	549	267	NP	13	15	2	NP	13	12	10	NP
56	36	8	8	NP	36	8	8	NP	283	376	242	NP	1	4	6	NP	7	12	6	NP

N: no mostró la conducta. NP: no probado. P: número de la prueba copulatoria. LM: latencia de monta. LI: latencia de intromisión. LE: latencia de eyaculación. NM: número de montas. NI: número de intromisiones. (s): segundos.



Effects of chronic estradiol or testosterone treatment upon sexual behavior in sexually sluggish male rats

Edwards Antonio-Cabrera, Raúl G. Paredes*

Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 November 2011

Received in revised form 10 January 2012

Accepted 24 January 2012

Available online 28 January 2012

Keywords:

Sexually sluggish

Testosterone

Estradiol

Silastic capsules

ABSTRACT

Sexually sluggish (SS) male rats represent a small proportion of animals that take a long time to ejaculate, or sometimes they do not ejaculate, when tested on repeated occasions with sexually receptive females. The current study was done in order to evaluate whether chronic estradiol (E_2) or testosterone (T) treatment could induce consistent ejaculatory behavior in these male rats. Those males that displayed sexual behavior but did not ejaculate in at least four of five tests were classified as SS and included in the present experiment. They were implanted subcutaneously with Silastic capsules that were empty or filled with E_2 or T. Starting one week after the implant, subjects were tested weekly with sexually receptive females for seven consecutive weeks. At the end of the experiment all subjects were weighed and sacrificed to weigh the accessory sex glands. The results showed that SS males implanted with an empty or T-filled capsule remained as such; they displayed mounts and intromissions but not a consistent pattern of ejaculation despite the twelve weeks of testing (5 screening tests and 7 with the corresponding implant). In contrast, the percentage of SS males implanted with an E_2 capsule that displayed the ejaculatory pattern was significantly reduced. Subjects treated with E_2 also displayed a higher number of mounts than the empty capsule group during several weeks of testing. At the end of the experiment the weights of the body, testicles, epididymis, seminal vesicles, and prostate of the SS male rats chronically treated with E_2 were lower than those of the empty or T capsule groups. In addition, male rats with a T implant showed lower testicular weight than the empty capsule group. These results suggest that the lack of ejaculation pattern in SS male rats is not due to estrogenic or androgenic alteration.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

It is well established that execution of sexual behavior improves with copulatory experience. For example, sexually experienced (SE) male rats copulate with shorter latencies to mount, intromit, and ejaculate and with fewer mounts and intromissions preceding ejaculation (Dewsbury, 1969; Larsson, 1959). Precontact ultrasonic vocalizations increase with sexual experience as well (Bialy et al., 2000). The SE males usually ejaculate after about 10 intromissions within 10 to 15 min of being placed with a sexually receptive female (Hull and Wood, 2006). But there are some males that take a long time to ejaculate or fail to reach ejaculation in tests of 30 min or even 1 h (Damassa et al., 1977; Kohlert and Bloch, 1996; Portillo et al., 2006). These animals are called sexually sluggish (SS) and have been described in several species such as rams (Alexander et al., 1999), rhesus monkey (Phoenix and Chambers, 1988) and rats (De Gasperin-Estrada et al., 2008; Portillo et al., 2006). Kohlert and Bloch (1996) reported that SS male rats do not show alterations in selective attention or in the ability to learn an

active avoidance task. Furthermore, no deficits in general activity, locomotor activity, or approach-avoidance behavior as measured in the elevated plus maze are observed in SS male rats in comparison to normal ejaculators (Pattij et al., 2005). This evidence suggests that SS male rats have no cognitive deficits that could explain their inability to ejaculate. We have previously shown that SS male rats have a clear preference to interact with a sexually receptive female and show a clear preference for estrous female bedding as opposed to anestrous or clean bedding. However, time spent investigating estrous bedding was significantly shorter in SS when compared to SE male rats (Portillo et al., 2006). When exposed to odors from estrous female bedding, the structures of the vomeronasal projection pathway were equally activated in SE and SS male rats (Portillo et al., 2006), demonstrating that SS male rats do not have alterations in their olfactory system or deficits in processing sexually relevant, olfactory cues. This was confirmed in a follow up study in which we demonstrated that SS males can discriminate between sexually relevant and non sexual odors using a habituation dehabituation test (De Gasperin-Estrada et al., 2008). In the same study we demonstrated that sexually receptive females spent the same time in the incentive zone of SS and SE males, suggesting that SS and SE males are equally attractive to females.

The deficits observed in ejaculatory behavior in SS male rats are not associated with alterations in plasma concentration of T or E_2 .

* Corresponding author at: Instituto de Neurobiología, Apartado Postal 1-1141, Querétaro, Qro. 76001, México. Fax: +52 442 234 0344.

E-mail address: rparedes@servidor.unam.mx (R.G. Paredes).

For example, Damassa et al. (1977) found no difference in plasma T concentration between male rats which intromit in 30 min mating tests and those that did not intromit in several mating tests (Damassa et al., 1977). Similarly, we previously found no differences in T or E₂ plasma concentration between male rats that ejaculated in three mating tests and those which displayed sexual behavior but did not reach ejaculation in any of the mating tests (Portillo et al., 2006). The early studies that evaluated the effects of hormones upon animals with different abilities to display sexual behavior did not clearly differentiate between non-copulating males (NC), those that do not display mounts, intromissions, or ejaculations in several tests with receptive females, from SS males. For example, in his classical study, Damassa et al. (1977) classified as NC those males that had not intromitted on any of seven tests, but it is clear that they could have displayed mounts. Similarly, Craig et al. (1954, and references therein) classified male rats as non-breeders or SS if they were exposed to different females for several estrous periods and the females were not pregnant. Although they did not impregnate females, these males clearly could have displayed mounts, intromissions, and even ejaculation.

It has long been established that sexual behavior in male mammals is regulated by testosterone (T) and estradiol (E₂). For example, in the male rat, castration results in the loss of sexual behavior that is restored after replacement therapy with T or E₂ (Damassa et al., 1977; Harding and Velotta, 2011; Larsson, 1979; McGinnis and Dreifuss, 1989). In the same way, restoration of copulatory behavior in castrated male rats given T filled silastic capsules is prevented by the concurrent administration of the androgen receptor (AR) antagonist Sch 16423 (McGinnis and Mirth, 1986) or by aromatase inhibitors (Moralí et al., 1977) suggesting that both androgen and estrogens, formed via neural aromatization of circulating T, are required for the full display of male sexual behavior (review in Baum, 2003). Early studies in gonadally intact rats receiving daily injections of estradiol benzoate (EB) have yield contradictory results. While some studies have found an inhibition of sexual behavior (Davidson, 1969) others have found no effects. Moreover, in an early study it was demonstrated that daily administration of EB stimulated precocious appearance of mounts, intromissions and to a lesser extent ejaculation in prepubertal male rats (Baum, 1972). The aim of the present study was to evaluate whether high chronic E₂ would induce ejaculatory behavior and to carefully reevaluate whether chronic T treatment would induce ejaculatory behavior in SS male rats.

2. Methods

2.1. Subjects

Sexually naive adult male Wistar rats (380–400 g) obtained from the breeding colony at the Instituto de Neurobiología of the Universidad Nacional Autónoma de México were housed in groups of four. Standard laboratory rat chow and water were available ad libitum throughout the experiment. Subjects were maintained in a room with controlled temperature (25 ± 1 °C) and under a reverse light–dark cycle (12 h–12 h). Stimulus females of the same strain (200–300 g) were brought into estrous by hormone treatment. They were gonadectomized (GDX) and subcutaneously injected with 25 µg/rat of EB 48 h before and with 1 mg/rat of progesterone (P) 4 h before the mating tests. All experiments were approved by the local animal care committee and were carried out in accordance with the “Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud” of the Mexican Health Ministry that follows NIH guidelines.

2.2. Male sexual behavior screening tests

All males were given five mating training tests of 30 min, separated by at least 24 h. All the observations were done 2 h after the onset of darkness and under dim red light. Males were transferred to mating cages (40 × 60 × 40 cm). After a 5 min adaptation period, one receptive

female was placed with each male. The following parameters were recorded: mount and intromission latencies (time from introduction of the male into the test cage until the first mount with pelvic thrusting and the first intromissive behavior pattern, respectively), ejaculation latency (time from the first intromissive behavior pattern until the first ejaculation behavior pattern), number of mounts and number of intromissions. Sexually sluggish (SS) males, those that displayed sexual behavior but did not display the ejaculatory pattern in at least four of five tests, were included in the experiment.

2.3. Hormonal treatment and sexual behavior tests

One week after the last screening test the SS male rats received subcutaneous implants of a Silastic capsule (2.0 cm length; 1.98 mm i.d.; 3.18 mm o.d.; Dow Corning Corp) either empty (N=9) or filled with T (N=9) or E₂ (N=10), under deep anaesthesia using ketamine (95 mg/kg) and xylazine (12 mg/kg). Early studies showed that these Silastic capsules release T or E₂ at a rate of ~30 µg/day/cm (Stratton et al., 1973) and 2.4 µg/day/cm (Robaire et al., 1979), respectively. Indeed, a Silastic capsule of 2.0 cm yields 1.52 ± 0.22 ng/mL of T ten days after implantation to castrated male rats (Moger, 1976), while a dose of 30 mg in the 2.0 cm Silastic capsule yields 0.143 ± 0.0239 ng/mL of E₂ (Rajkumar et al., 2001). Starting one week after surgery, all animals were tested weekly for seven weeks for sexual behavior with sexually receptive females. The percentage of SS male rats that displayed mounts, intromissions and ejaculations was registered. The number of mounts and intromissions patterns, as well, latencies of mounts, intromissions, and ejaculation were also registered in each mating test. At the end of the experiment all animals were weighed and sacrificed. Testicles, epididymis, prostate, and seminal vesicles were removed and weighed.

2.4. Statistical analysis

The percentage of SS male rats that displayed mounts, intromissions, and ejaculations in each test was analyzed using a Chi-square test followed by a Fisher's exact test. Number of mounts and intromissions as well as mount, intromission and ejaculation latency data did not pass the normality test; therefore, they were analyzed using the Kruskal Wallis test followed by a post hoc Dunn's test. The data for body, testicle, epididymis, seminal vesicle, and prostate weight passed the normality test and therefore, were analyzed using a one-way analysis of variance followed by a post-hoc Tukey test.

3. Results

3.1. Percentage of SS male rats that displayed copulation

Subjects were observed in a total of 12 tests, 5 screening tests followed by 7 tests with their corresponding implant. The males classified as SS were selected because they failed to ejaculate in at least 4 out of 5 screening mating tests. The results show that they continued to show SS behavior throughout testing. In the seven weeks of testing following the implant the subjects that had been implanted with an empty or T capsule showed a more consistent pattern of mounts and intromissions (see Fig. 1A and B) but only 60% of the animals ejaculated in the seven weeks with the empty implant (see Fig. 1C). The chronic T or E₂ treatment did not modify the percentage of SS male rats that displayed mounts or intromissions. In contrast, the percentage of SS male rats that ejaculated was lower in subjects treated with E₂ than in those treated with T or in the group implanted with an empty capsule. As shown in Fig. 1C, chronic E₂ treatment significantly reduced the percentage of male rats that ejaculated in the seventh (vs empty), eighth (vs T), eleventh, and twelfth (vs empty and T) week of testing.

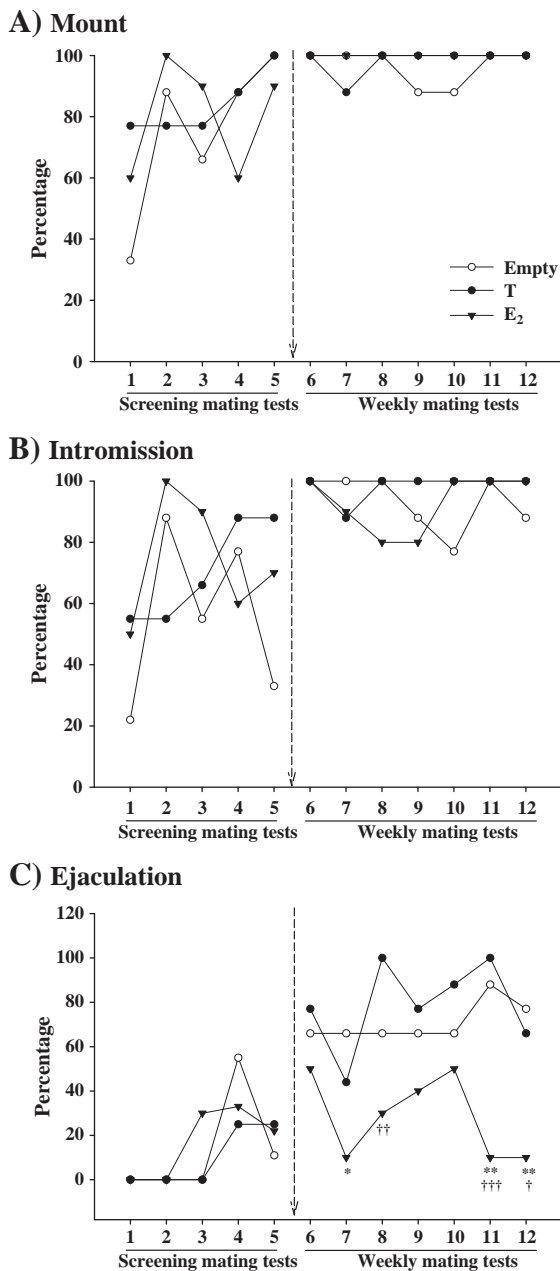


Fig. 1. Percentage of SS male rats displaying mounts (A), intromissions (B) and ejaculation (C) in the mating screening tests and after they were subcutaneously implanted with either an empty ($N=9$) or a T ($N=9$) or an E_2 ($N=10$) silastic capsule. The arrow indicates the beginning of chronic treatment. *Different from empty group: $p<0.05$; ** $p<0.01$. †Different from T group: $p<0.05$; †† $p<0.01$; ††† $p<0.001$.

3.2. Copulatory parameters of SS male rats that displayed copulation

The number of mounts was significantly different between groups in weeks 10 (Kruskal–Wallis $H=13,473$; $p=0.001$), 11 (Kruskal–Wallis $H=11,790$; $p=0.003$) and 12 (Kruskal–Wallis $H=10,407$; $p=0.005$). The number of mounts was higher in the SS male rats with chronic E_2 treatment when tested on weeks 10, 11, and 12 (see Table 1) compared to the control group and to the group implanted with T on week 11. With respect to mount and intromission latency, no consistent differences were found, except that the mount latency on week seven was shorter in the group treated with T than in the empty capsule group. On week 12 the intromission latency of the animals implanted with E_2 was higher than the other 2 groups (see Table 2).

3.3. Body weight and weight of the accessory sex glands of the SS male rats

At the end of the evaluation period, we observed that SS male rats implanted with E_2 had a lower body weight than the other 2 groups (see Fig. 2A). Subjects implanted with E_2 also showed a reduced weight in testicles, epididymis, seminal vesicles, and prostate than the other two groups. Testicle weight was lower in subjects implanted with T than in males implanted with an empty capsule (see Fig. 2B).

4. Discussion

The SS male rats displayed mounts and intromissions but only a small proportion ejaculated in the mating screening tests. Moreover, as we have previously shown these animals ejaculate infrequently or do not ejaculate even after repeated testing for up to 9 weeks (Portillo et al., 2006). The present experiment expanded these observations to 12 copulatory tests (5 screening tests and 7 with the corresponding implant) and as can be seen only about 60 percent of the animals displayed the ejaculatory pattern and only two of the subjects of this group ejaculated in all the tests. We also observed that chronic treatment with E_2 , but not T, decreases the percentage of SS male rats that ejaculate.

The results observed with the chronic EB treatment are in agreement with previous observations in gonadally intact male rats, where the injection of 200 μg of EB for ten days inhibited sexual behavior (Davidson, 1969). In contrast, Sodersten (1973) observed that injection of 200 μg of EB for three weeks in gonadally intact male rats did not produce significant changes in sexual behavior. Some of the discrepancies might be due to differences in sexual experience of the subjects. For example, castrated sexually experienced males treated with EB show a copulatory behavior indistinguishable from that of males treated with T (e.g. Sodersten, 1973). However, in castrated sexually inexperienced males, E_2 stimulated mount and intromission but ejaculation was rare (Beach, 1942; Pfaff, 1970). Similar observations have been described with respect to sexual approach behaviors. Atilla and colleagues (2010) evaluated sexual incentive motivation in castrated male rats after different hormonal treatments. In subjects implanted with a Silastic capsule containing E_2 , 80% mounted, 60% intromitted and 30% ejaculated. In addition, E_2 was unable to restore sexual incentive motivation; that is, implanted males showed no preference for a receptive female over a male (Atilla et al., 2010). The inhibitory effect of E_2 in the ejaculatory response of SS male rats could be associated, as indicated by Davidson (1969), with an inhibition of T synthesis caused by an inhibitory action of E_2 on gonadotropin release (Gans, 1959). However, the fact that a high proportion (more than 80%) of the SS males implanted with E_2 displayed mounts and intromissions suggest that E_2 is able to induce and maintain sexual behavior, but is not able to reduce the ejaculation threshold in SS males.

As expected, we also observed that at the end of the chronic E_2 treatment, males had lower body weight, and the weights of their testicles, epididymis, seminal vesicles, and prostate were lower than the T treated or control groups. These results are in agreement with previous studies showing that in intact male rats a chronic treatment with 200 pg/mL of circulating E_2 induces a regression of seminal vesicles and decrease of ventral prostate weight (Brewster et al., 1997) and that a higher dose (200 $\mu\text{g/Kg}$) of EB administered to gonadally intact male rats produces involution of the interstitial Leydig cells (Davidson, 1969) or testicular atrophy (Sodersten, 1973). The lower body weight is explained by the well known hypophagic effect of E_2 (Ganesan, 1994). In the present study chronic T treatment in SS male rats induced a size reduction only of the testicles (see Fig. 2) which is similar to the reduction observed in adult male rats treated with testosterone cypionate for 12 weeks (Clark et al., 1997).

Table 1

Number of mounts (MN) and intromissions (IN) in SS male rats in the mating screening tests and after they were subcutaneously implanted with either an empty or a T or an E₂ capsule (Mean ± standard error).

Mating test	Number of mounts						Number of intromissions					
	Empty	N	T	N	E ₂	N	Empty	N	T	N	E ₂	N
1	6.0 ± 2.6	4	33.0 ± 12.2	7	26.2 ± 6.9	6	12.0 ± 4.0	2	4.4 ± 1.5	5	11.8 ± 2.6	5
2	21.5 ± 2.6	8	25.4 ± 6.2	7	22.8 ± 6.4	10	10.5 ± 2.3	8	13.0 ± 2.8	5	8.0 ± 1.7	10
3	15.6 ± 2.8	6	37.2 ± 13.9	6	29.8 ± 4.8	9	11.6 ± 3.8	5	10.0 ± 2.5	6	16.2 ± 4.8	9
4	26.3 ± 3.3	8	26.4 ± 8.4	8	31.5 ± 4.3	7	20.9 ± 2.8	7	17.2 ± 5.1	6	14.4 ± 3.4	7
5	9.0 ± 3.2	9	23.0 ± 7.6	9	28.0 ± 6.1*	10	15.7 ± 4.4	3	9.4 ± 2.0	8	8.9 ± 2.2	8
<i>Beginning of the hormonal treatment</i>												
6	12.4 ± 2.6	9	17.9 ± 5.4	9	23.9 ± 5.0	10	13.3 ± 2.0	9	13.1 ± 1.4	9	11.5 ± 2.1	10
7	11.9 ± 3.0	9	24.3 ± 8.5	9	36.3 ± 9.7	10	9.3 ± 2.1	9	9.1 ± 1.3	8	12.1 ± 2.4	9
8	12.0 ± 5.5	9	23.3 ± 5.8	9	23.7 ± 6.5	10	10.7 ± 1.6	9	12.7 ± 2.7	9	11.9 ± 2.8	8
9	14.4 ± 3.9	8	15.2 ± 2.6	9	19.4 ± 3.7	10	12.6 ± 4.2	8	15.2 ± 3.4	5	21.8 ± 3.8	8
10	5.9 ± 1.1	8	11.6 ± 2.7	9	23.2 ± 4.2**	10	11.3 ± 1.5	7	14.1 ± 2.2	9	12.0 ± 2.1	10
11	10.3 ± 3.2	9	9.1 ± 1.9	9	25.7 ± 3.6*††	10	9.8 ± 1.3	9	11.6 ± 1.7	9	18.0 ± 3.0	10
12	6.9 ± 1.9	9	10.6 ± 2.3	9	19.3 ± 3.1**	10	11.3 ± 1.4	8	11.1 ± 1.6	9	10.6 ± 1.7	10

*Significantly different from empty capsule group: $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

††Significantly different from testosterone capsule group: $p < 0.01$.

Early studies attempted to stimulate sexual behavior in SS male rats by administering high doses of T (Beach, 1940; Stone, 1938; Whalen et al., 1961). For example, Stone (1938) found that male rats whose copulatory behavior was deficient in preliminary tests did not improve copulation after systemic administration of testosterone propionate. Damassa et al. (1977) observed that subcutaneous implant with T Silastic capsules, which yield 5.18 ng/mL of plasmatic T together with repeated testing, induced ejaculation behavior in ten of twelve animals which did not intromit in previous mating screening tests. Moreover, male rats that ejaculated showed the full normal mating pattern in almost all subsequent tests. However, as mentioned by Damassa et al. (1977) their experiment did not distinguish the effects of repeated

testing from those of exposure to constant androgen levels. The ineffectiveness of T treatment for improving sexual behavior performance in SS male rats has been observed in other species of mammals (Phoenix and Chambers, 1988; Riss and Young, 1954). Phoenix and Chambers (1988) reported that daily T administration (1 mg/Kg) for 35 days failed to enhance sexual performance in young Rhesus males (*Macaca mulatta*) that ejaculated in less than 50% of sexual behavior tests. In the present experiment males chronically treated with T failed to display consistent ejaculatory behavior.

In male mammals it is well established that both androgens and estrogens, formed via neural aromatization of circulating T, are required for the full display of male sexual behavior and the establishment of partner preference (review in Baum, 2003). Male rats with prenatal androgen blockade show a decrease in coital behavior, when tested as adults (Clemens et al., 1978; Dominguez-Salazar et al., 2002). On the other hand, male rats treated prenatally and shortly after birth with the aromatase inhibitor ATD showed a clear preference for a stimulus male instead of an estrous female. Moreover, these males showed normal mounting and intromissive behavior but their ability to ejaculate was reduced (Brand et al., 1991). Similar results have been described in mice with null mutations of the *Cyp19* aromatase gene. As adults, these males showed reduced mounts, intromissions, and ejaculations when tested with estrous females (Honda et al., 1998; Toda et al., 2001). Similar results were observed if they were castrated and given testosterone propionate (Bakker et al., 2002). They also sire fewer litters than wild type controls (Toda et al., 2001). One possible explanation for the results of the present experiment is that the essential role of neural aromatization of circulating T in controlling male-typical sexual differentiation of brain and behavior is affected during development in SS male rats.

Other studies have evaluated the effects of neurotransmitters upon sexual behavior in SS males. For example, it was observed that in male rats that failed to ejaculate in five screening tests the intramuscular injection of the opioid antagonist naloxone (4 mg/Kg) induced ejaculatory behavior in 74% of the treated animals. The percentage of animals injected with naloxone that ejaculated returned to the low baseline level when tested one week later after saline injection (Gessa et al., 1979). Similar results were observed in SS male rats treated with the serotonin 1A receptor agonist (\pm)-8-hydroxy-2-(di-n-propyl-amino) tetralin hydrobromide (8-OH-DPAT). In that study a clear induction of male sexual behavior was observed in SS male rats treated with 8-OH-DPAT. However, when the animals were tested one week later under drug free conditions they displayed low levels of sexual behavior, similar to those seen before the treatment. Moreover, the facilitation of ejaculation induced by 8-OH-DPAT was not associated with an induction of conditioned place preference (Camacho

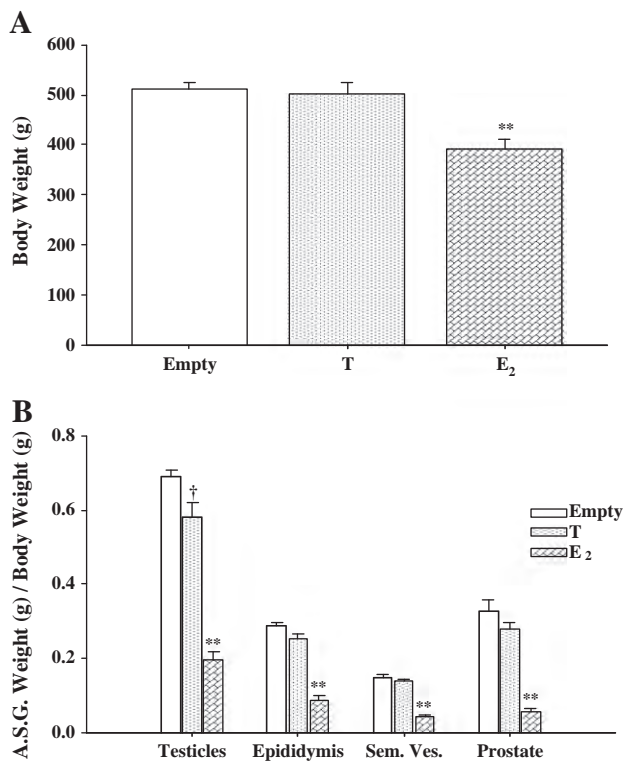


Fig. 2. (A) Body and (B) accessory sex glands (ASG) weight at the end of the experiment in SS male rats subcutaneously implanted with either an empty (N = 9), a T (N = 9) or an E₂ (N = 10) silastic capsule (Mean ± standard error). **Different from empty and T groups: $p < 0.01$. †Different from empty group: $p < 0.05$.

Table 2
Mount (ML), intromission (IL), and ejaculation latencies (EL) in SS male rats in the mating screening tests and after they were implanted with either an empty or a T or an E₂ capsule (Mean ± standard error, data in seconds).

Mating test	Mount latency (ML)			Intromission latency (IL)			Ejaculation latency (EL)					
	Empty	T	E ₂	Empty	T	E ₂	Empty	N	T	N	E ₂	N
1	108.3 ± 27.1	152.1 ± 91.4	127.5 ± 41.8	376.0 ± 107.0	656.4 ± 305.7	202.0 ± 66.5	–	–	–	–	–	–
2	123.8 ± 41.1	83.3 ± 28.5	439.3 ± 180.5	267.6 ± 64.6	339.4 ± 200.5	516.0 ± 175.5	–	–	–	–	–	–
3	186.3 ± 104.1	320.9 ± 184.3	74.2 ± 21.9	164.8 ± 64.3	472.0 ± 233.5	273.8 ± 101.4	–	–	–	–	1203.0 ± 394.7	3
4	322.9 ± 176.5	198.9 ± 138.4	101.8 ± 26.5	212.7 ± 128.8	250.7 ± 152.3	337.4 ± 186.6	1318.4 ± 168.9	5	770.0 ± 140.0	2	1037.0 ± 243.9	3
5	109.8 ± 48.1	133.5 ± 60.8	146.1 ± 58.1	113.3 ± 26.2	373.1 ± 162.5	180.7 ± 52.7	616.0	1	1112.5 ± 223.5	2	1093.0 ± 282.0	2
<i>Beginning of the hormonal treatment</i>												
6	171.0 ± 68.8	58.0 ± 25.4	65.7 ± 19.2	263.0 ± 153.0	162.1 ± 85.7	209.6 ± 113.8	652.0 ± 98.0	6	721.6 ± 106.6	7	953.0 ± 110.7	5
7	177.7 ± 69.1	25.3 ± 11.1*	74.0 ± 19.0	546.3 ± 194.1	108.6 ± 35.5	198.8 ± 66.3	781.0 ± 128.4	6	529.0 ± 231.3	4	1546.0	1
8	73.9 ± 27.9	20.7 ± 8.2	92.6 ± 44.3	196.4 ± 88.5	39.9 ± 15.0	271.0 ± 115.8†	480.5 ± 87.4	6	868.3 ± 149.2	9	932.0 ± 126.0	3
9	63.9 ± 23.7	217.3 ± 140.4	136.6 ± 65.9	260.6 ± 165.1	228.2 ± 148.8	143.5 ± 67.0	737.7 ± 174.3	6	714.4 ± 110.7	7	853.0 ± 170.3	4
10	260.6 ± 159.9	77.4 ± 66.2	26.0 ± 8.1	109.0 ± 57.6	101.3 ± 85.2	147.0 ± 47.5	770.8 ± 103.6	6	725.1 ± 124.5	8	1124.8 ± 219.6	5
11	47.6 ± 20.4	57.7 ± 48.2	44.0 ± 15.7	100.4 ± 34.1	60.7 ± 47.8	84.9 ± 22.7	771.8 ± 106.6	8	500.0 ± 88.0	9	1438.0	1
12	113.2 ± 72.5	52.8 ± 35.1	69.9 ± 18.0	46.8 ± 21.8	103.1 ± 32.4	381.7 ± 127.6*†	697.0 ± 139.6	7	667.5 ± 151.7	6	1484.0	1

*Different from empty group: $p < 0.05$.

†Different from T group: $p < 0.05$.

et al., 2007) that is normally seen after mating in males (Agmo and Berenfeld, 1990; Martinez and Paredes, 2001) indicating that despite the fact that the male rats ejaculated with fewer intromissions after 8-OH-DPAT treatment, sexual behavior was not rewarding (Camacho et al., 2007). It appears then, that the facilitation of sexual behavior in animals with low sexual activity induced by different drugs could be associated with factors not directly related to sexual behavior, such as increased general arousal or increased locomotor activity. Such an argument has also been proposed for the facilitation of sexual behavior induced in males by caffeine (Agmo and Villalpando, 1995) and dopaminergic compounds (Paredes and Agmo, 2004).

Our results indicate that SS male rats remained unchanged despite the fact that they were repeatedly tested for 12 weeks with receptive females. They also demonstrate that chronic treatment with E₂ or T does not induce sexual behavior to levels similar to sexually experienced male rats. These results suggest that failure to ejaculate in SS male rats might be due to alterations in the essential role of neural aromatization of circulating T in controlling male-typical differentiation in brain and sexual behavior in male rats.

Acknowledgments

We thank Francisco Camacho, Leonor Casanova, Omar González, Ramón Martínez, Ma. De Lourdes Lara, Martín García, and Javier Valles for their excellent technical assistance. Research supported by grants 53547 CONAcYt and IN213609 DGAPA.

References

- Agmo A, Berenfeld R. Reinforcing properties of ejaculation in the male rat: role of opioids and dopamine. *Behav Neurosci* 1990;104:177–82.
- Agmo A, Villalpando A. Central nervous stimulants facilitate sexual behavior in male rats with medial prefrontal cortex lesions. *Brain Res* 1995;696:187–93.
- Alexander BM, Stellflug JN, Rose JD, Fitzgerald JA, Moss GE. Behavior and endocrine changes in high-performing, low-performing, and male-oriented domestic rams following exposure to rams and ewes in estrus when copulation is precluded. *J Anim Sci* 1999;77:1869–74.
- Attila M, Oksala R, Agmo A. Sexual incentive motivation in male rats requires both androgens and estrogens. *Horm Behav* 2010;58:341–51.
- Bakker J, Honda S, Harada N, Balthazart J. Sexual partner preference requires a functional aromatase (cyp19) gene in male mice. *Horm Behav* 2002;42:158–71.
- Baum MJ. Precocious mating in male rats following treatment with androgen or estrogen. *J Comp Physiol Psychol* 1972;78:356–67.
- Baum MJ. Activation and organizational effects of estradiol on male behavioral neuroendocrine function. *Scand J Psychol* 2003;44:213–20.
- Beach FA. Effects of cortical lesions upon the copulatory behavior of male rats. *J Comp Psychol* 1940;29:193–245. [1921].
- Beach FA. Copulatory behavior in prepuberally castrated male rats and its modification by estrogen administration. *Endocrinology* 1942;31:679–83.

- Bialy M, Rydz M, Kaczmarek L. Precontact 50-kHz vocalizations in male rats during acquisition of sexual experience. *Behav Neurosci* 2000;114:983–90.
- Brand T, Kroonen J, Mos J, Slob AK. Adult partner preference and sexual behavior of male rats affected by perinatal endocrine manipulations. *Horm Behav* 1991;25:323–41.
- Brewster ME, Anderson WR, Pop E. Effect of sustained estradiol release in the intact male rat: correlation of estradiol serum levels with actions on body weight, serum testosterone, and peripheral androgen-dependent tissues. *Physiol Behav* 1997;61:225–9.
- Camacho FJ, Castro M, Hernandez V, Paredes RG. Facilitation of ejaculation induced by 8-OH-DPAT does not produce conditioned place preference in male rats. *Behav Neurosci* 2007;121:579–85.
- Clark AS, Harrold EV, Fast AS. Anabolic-androgenic steroid effects on the sexual behavior of intact male rats. *Horm Behav* 1997;31:35–46.
- Clemens LG, Gladue BA, Coniglio LP. Prenatal endogenous androgenic influences on masculine sexual behavior and genital morphology in male and female rats. *Horm Behav* 1978;10:40–53.
- Craig JV, Casida LE, Chapman AB. Male infertility associated with lack of libido in the rat. *Am Nat* 1954;88:365–72.
- Damassa DA, Smith ER, Tennent B, Davidson JM. The relationship between circulating testosterone levels and male sexual behavior in rats. *Horm Behav* 1977;8:275–86.
- Davidson JM. Effects of estrogen on the sexual behavior of male rats. *Endocrinology* 1969;84:1365–72.
- De Gasperin-Estrada GP, Camacho FJ, Paredes RG. Olfactory discrimination and incentive value of non copulating and sexually sluggish male rats. *Physiol Behav* 2008;93:742–7.
- Dewsbury DA. Copulatory behaviour of rats (*Rattus norvegicus*) as a function of prior copulatory experience. *Anim Behav* 1969;17:217–23.
- Dominguez-Salazar E, Portillo W, Baum MJ, Bakker J, Paredes RG. Effect of prenatal androgen receptor antagonist or aromatase inhibitor on sexual behavior, partner preference and neuronal Fos responses to estrous female odors in the rat accessory olfactory system. *Physiol Behav* 2002;75:337–46.
- Ganesan R. The aversive and hypophagic effects of estradiol. *Physiol Behav* 1994;55:279–85.
- Gans E. The F.S.H.-content of serum of intact and of gonadectomized rats and of rats treated with sex hormones. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1959;32:362–72.
- Gessa GL, Paglietti E, Quarantotti BP. Induction of copulatory behavior in sexually inactive rats by naloxine. *Science* 1979;204:203–5.
- Harding SM, Velotta JP. Comparing the relative amount of testosterone required to restore sexual arousal, motivation, and performance in male rats. *Horm Behav* 2011;59:666–73.
- Honda S, Harada N, Ito S, Takagi Y, Maeda S. Disruption of sexual behavior in male aromatase-deficient mice lacking exons 1 and 2 of the cyp19 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;252:445–9.
- Hull E, Wood Rea. Neurobiology of male sexual behavior. In: Neill J, editor. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. San Diego: Academic Press; 2006. p. 1729–823.
- Kohler JG, Bloch GJ. Hyperactivity in hyposexual male rats. *Physiol Behav* 1996;59:171–8.
- Larsson K. Experience and maturation in the development of sexual behaviour in male puberty rat. *Behaviour* 1959;14:101–7.
- Larsson K. Features of neuroendocrine regulation of masculine sexual behavior. In: Beyer C, editor. *Endocrine control of sexual behavior*. New York: Raven Press; 1979. p. 77–163.
- Martinez I, Paredes RG. Only self-paced mating is rewarding in rats of both sexes. *Horm Behav* 2001;40:510–7.
- McGinnis MY, Dreifuss RM. Evidence for a role of testosterone-androgen receptor interactions in mediating masculine sexual behavior in male rats. *Endocrinology* 1989;124:618–26.
- McGinnis MY, Mirth MC. Inhibition of cell nuclear androgen receptor binding and copulation in male rats by an antiandrogen. *Sch 16423. Neuroendocrinology* 1986;43:63–8.

- Moger WH. Effect of testosterone implants on serum gonadotropin concentrations in the male rat. *Biol Reprod* 1976;14:665–9.
- Morali G, Larsson K, Beyer C. Inhibition of testosterone-induced sexual behavior in the castrated male rat by aromatase blockers. *Horm Behav* 1977;9:203–13.
- Paredes RG, Agmo A. Has dopamine a physiological role in the control of sexual behavior? A critical review of the evidence. *Prog Neurobiol* 2004;73:179–226.
- Pattij T, de Jong TR, Uitterdijk A, Waldinger MD, Veening JG, Cools AR, et al. Individual differences in male rat ejaculatory behaviour: searching for models to study ejaculation disorders. *Eur J Neurosci* 2005;22:724–34.
- Pfaff D. Nature of sex hormone effects on rat sex behavior: specificity of effects and individual patterns of response. *J Comp Physiol Psychol* 1970;73:349–58.
- Phoenix CH, Chambers KC. Testosterone therapy in young and old rhesus males that display low levels of sexual activity. *Physiol Behav* 1988;43:479–84.
- Portillo W, Diaz NF, Retana-Marquez S, Paredes RG. Olfactory, partner preference and Fos expression in the vomeronasal projection pathway of sexually sluggish male rats. *Physiol Behav* 2006;88:389–97.
- Rajkumar L, Guzman RC, Yang J, Thordarson G, Talamantes F, Nandi S. Short-term exposure to pregnancy levels of estrogen prevents mammary carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:11755–9.
- Riss W, Young WC. The failure of large quantities of testosterone propionate to activate low drive male guinea pigs. *Endocrinology* 1954;54:232–5.
- Robaire B, Ewing LL, Irby DC, Desjardins C. Interactions of testosterone and estradiol-17 beta on the reproductive tract of the male rat. *Biol Reprod* 1979;21:455–63.
- Sodersten P. Estrogen-activated sexual behavior in male rats. *Horm Behav* 1973;4:247–56.
- Stone CP. Activation of impotent male rats by injections of testosterone propionate. *J Comp Psychol* 1938;25:445–50. [1921].
- Stratton LG, Ewing LL, Desjardins C. Efficacy of testosterone-filled polydimethylsiloxane implants in maintaining plasma testosterone in rabbits. *J Reprod Fertil* 1973;35:235–44.
- Toda K, Okada T, Takeda K, Akira S, Saibara T, Shiraishi M, et al. Oestrogen at the neonatal stage is critical for the reproductive ability of male mice as revealed by supplementation with 17beta-oestradiol to aromatase gene (Cyp19) knockout mice. *J Endocrinol* 2001;168:455–63.
- Whalen RE, Beach FA, Kuehn RE. Effects of exogenous androgen on sexually responsive and unresponsive male rats. *Endocrinology* 1961;69:373–80.