



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

EVALUACIÓN DE LA ENDOCITOSIS POR ENDOMORFINA-1 Y  
CONDUCTA SEXUAL DEL RECEPTOR OPIOIDE MU EN EL  
ÁREA PREÓPTICA MEDIAL Y AMÍGDALA MEDIAL  
POSTERODORSAL EN LA RATA MACHO DE LA CEPA *wistar*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
BIÓLOGA

P R E S E N T A:

IVONNE SAUCEDO LÓPEZ

DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. LETICIA PARRA GÁMEZ

(2015)



Los Reyes Iztacala, Naucalpan, Edo. de México



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Jurado de examen:**

**Presidente** Dr. Jorge Ricardo Gersenowies Rodríguez

**Vocal** Dra. Patricia Rivas Manzano

**Secretario** Dra. Leticia Parra Gámez

**Suplente** Mtra. Carmen Álvarez Rodríguez

**Suplente** Biol. Martha María de Lourdes Fregoso Padilla

A esa gran persona que me brinda  
su amor y me enseña a ser feliz,  
mi **Madre.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a la máxima casa de estudios la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por fomentar la mejor preparación para cada uno de sus alumnos.

Agradezco de corazón a la Dra. Leticia Parra Gámez por ser mi guía para la realización de este trabajo y por siempre plasmar su confianza en mí. Por estar presente no solo en la enseñanza académica sino también en mi vida personal. Gracias por ser ejemplo de una persona excepcional, brindar siempre lo mejor de sí y fomentar una empatía en la enseñanza.

A cada uno de los sinodales por brindarme su tiempo, comentarios y admirables conocimientos, al Dr. Jorge Ricardo Gersenowies Rodríguez, Dra. Patricia Rivas Manzano, Mtra. Carmen Álvarez Rodríguez, Biol. Martha María de Lourdes Fregoso Padilla.

Al equipo del Laboratorio de Neuroanatomía Funcional, que ya son muchos años de conocernos, convivencias y alegrías son lo que llenan los mejores recuerdos.

Ale, es una bendición en esta vida poder conocer personas como usted, nunca olvidare cada apoyo brindado, sonrisa que ha plasmado, la confianza que siempre ha tenido en mí, su tiempo y paciencia en enseñarme. Lo que más he aprendido de usted, es expresar alegría y cariño por todas aquellas personas que apreciamos. Y nunca terminaré de agradecerle.

Jacqueline, gracias desde que llegué al laboratorio me recibiste con una sonrisa en el rostro, se manejar material de laboratorio y hacer varias técnicas, tú me instruiste. Una persona como tu es única, positiva y sobre todo protectora. Gracias por tu tiempo y amistad.

Agradezco a mi querida familia, a mi Madre y Padre por su esfuerzo día con día y apoyarme sin pedirme nada a cambio y sin hacer preguntas. Por la enorme paciencia y confianza.

Maxi, por ser un gran hermano y compartir todos esos momentos alegres, por darme ánimos en malos momentos, me ayudaste a que esta etapa fuera más fácil, nunca dejaste de confiar en mí.

Solymer, te agradezco por hacer que mi vida diera un giro, tu guía y orientación me han ayudado mucho, todos esos lindos tiempos compartidos, platicas, consejos, por ser esa amistad que simplemente aparece sin pedirla.

Agradezco a todas aquellas personas (amigos y compañeros) que conocí en el transcurso de la carrera, aquellas personas que siempre me tendieron la mano y con las que compartí excelentes momentos académicos.

MUCHAS GRACIAS.

**El secreto del cambio es enfocar toda tu energía no en luchar contra lo viejo  
sino en construir lo nuevo.**

*Sócrates*

## RESUMEN

La conducta sexual masculina, es considerada un proceso fisiológico que libera opioides endógenos con dos posibles efectos: el primero para facilitarla y el segundo para potenciar las propiedades de recompensa en el apareamiento y eyaculación. En el circuito neuronal implicado en la rata macho se destacan el APM como un centro integrador y la MePD en la organización conductual. En los últimos años se han aportado datos relevantes que demuestran la participación del sistema opioide. La EM-1 es un opioide que participa en varias funciones incluyendo la actividad sexual copulatoria, su actividad biológica y respuesta fisiológica esta mediada por la activación del MOR.

En este trabajo se abordó la activación neuronal a través de la inmunorreactividad con la proteína c-Fos (IR-Fos) y la endocitosis del MOR tras la administración icv de la EM-1 en sitios importantes de la ejecución copulatoria, el APM y la MePD. El APM se dividió en subregiones (anterior, media y posterior) para la observación más específica de la participación de la EM-1. Se encontró una similitud entre el grupo expuesto a EM-1 y el grupo expuesto a hembras receptoras, presentando mayor actividad neuronal y mayor internalización del MOR, en comparación con los grupos que no fueron expuestos a hembras receptoras. La evidencia de este estudio sugiere que la EM-1 al igual que la ejecución de la cópula inducen activación neuronal así como endocitosis del MOR por lo que este péptido puede ser parte de un sistema mediador de propiedades gratificantes dentro de la conducta sexual masculina en la rata macho.

**Tabla. Abreviaturas**

| <b>Abreviaturas</b>          | <b>Definición</b>  |
|------------------------------|--|
| Am                           | amígdala medial  |
| APM                          | área preóptica medial  |
| BOA                          | bulbo olfatorio accesorio  |
| BOP                          | bulbo olfatorio principal  |
| DOR                          | receptor opioide delta   |
| EM-1                         | endomorfina-1  |
| EM-2                         | endomorfina-2  |
| icv                          | intracerebroventricular  |
| IR-Fos                       | inmunorreactividad a la proteína c-Fos                             |
| IR-MOR                       | inmunorreactividad al receptor opioide mu                          |
| KOR                          | receptor opioide kappa   |
| MePD                         | amígdala medial postdorsal   |
| MOR                          | receptor opioide mu  |
| NCET                         | núcleo cama de la estría terminal                                  |
| OVN                          | órgano vomeronasal   |
| SGP                          | sustancia gris periacueductal                                      |
| TBOA                         | tracto del bulbo olfatorio accesorio                               |
| <b>Grupos experimentales</b> |  |
| E                            | sujetos solos en la arena de cópula                                |
| E+                           | sujetos expuestos a hembras receptivas                             |
| E-                           | sujetos expuestos a hembras no receptivas                          |
| EcEM-1                       | sujetos con implante de cánula y administración de EM-1            |
| EcS                          | sujetos con implante de cánula y administración de solución salina |

## INDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>ANTECEDENTES .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>Conducta sexual de la rata macho de la cepa wistar.....</b>   | <b>1</b>  |
| Fase precopulatoria .....  | 1         |
| Fase copulatoria .....   | 2         |
| Fase postcopulatoria:.....   | 3         |
| <b>Parámetros para evaluar la conducta sexual en la rata macho.....</b>                                  | <b>4</b>  |
| Temporales.....  | 4         |
| Numéricos.....   | 4         |
| <b>Estructuras neuroanatómicas relacionadas con la conducta sexual. ....</b>                             | <b>5</b>  |
| Amígdala medial posterodorsal (MePD) .....   | 7         |
| Área preóptica medial (APM).....   | 8         |
| <b>Modulación opioide de la conducta sexual masculina.....</b>   | <b>9</b>  |
| Opioides.....  | 9         |
| Endomorfina.....   | 10        |
| Receptores a opioides .....  | 11        |
| Internalización de los receptores opioides.....  | 13        |
| <b>Los opioides en la conducta sexual masculina. ....</b>  | <b>14</b> |
| <b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>   | <b>16</b> |
| <b>HIPÓTESIS .....</b>   | <b>17</b> |
| <b>OBJETIVO GENERAL.....</b>   | <b>17</b> |
| <b>OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>   | <b>17</b> |
| <b>DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>  | <b>18</b> |
| <b>SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODO .....</b>  | <b>20</b> |
| <b>Animales.....</b>   | <b>20</b> |
| <b>Entrenamientos en la de conducta sexual.....</b>  | <b>20</b> |
| <b>Análisis de la conducta sexual.....</b>   | <b>21</b> |
| <b>Administración vía icv de EM-1. ....</b>  | <b>22</b> |
| <b>Fase 1. Efecto de la EM-1 en el APM y MePD administrada vía icv. ....</b>                             | <b>23</b> |
| <b>Fase 2. Evaluación de la expresión de MOR en el APM y MePD de animales sexualmente expertos. ....</b> | <b>24</b> |
| <b>Preparación del tejido.....</b>   | <b>24</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Muestreo del APM y MePD.....</b>       | <b>25</b> |
| <b>Conteo neuronal.....</b>               | <b>26</b> |
| <b>Inmunohistoquímica para c-Fos.....</b> | <b>27</b> |
| <b>Inmunohistoquímica para MOR.....</b>   | <b>28</b> |
| <b>RESULTADOS.....</b>                    | <b>31</b> |
| <b>IR-Fos en AMP.....</b>                 | <b>32</b> |
| <b>IR-Fos de MePD.....</b>                | <b>36</b> |
| <b>IR-MOR en APM.....</b>                 | <b>38</b> |
| <b>IR-MOR en MePD.....</b>                | <b>42</b> |
| <b>DISCUSIÓN.....</b>                     | <b>44</b> |
| <b>CONCLUSIÓN.....</b>                    | <b>51</b> |
| <b>Anexo 1.....</b>                       | <b>52</b> |
| <b>REFERENCIAS.....</b>                   | <b>53</b> |

## ANTECEDENTES

### **Conducta sexual de la rata macho de la cepa *wistar*.**

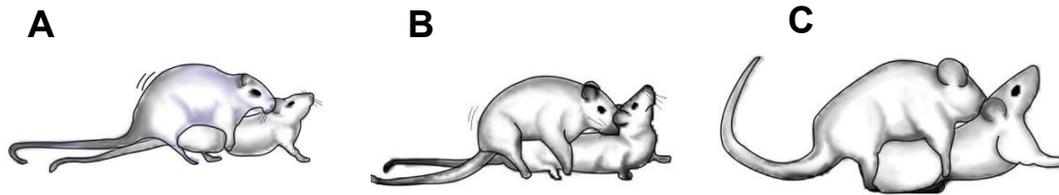
Una de las conductas más estudiadas en las últimas décadas es la conducta sexual de la rata macho de la cepa *wistar*, su comportamiento se compone de patrones estereotipados en donde se distinguen dos fases, la conducta apetitiva o motivacional y la consumación de la conducta sexual (Swaney *et al.*, 2012). En ambas fases la participación hormonal (estrógenos y progestinas) y neuroquímica (dopamina, noradrenalina, serotonina, oxitocina), son indispensables para desencadenar el deseo y excitación sexual, esto se podría definir como la preparación del sistema autónomo para la actividad sexual (Pfaus *et al.*, 2001).

La conducta sexual masculina, es considerada un proceso fisiológico que libera opioides endógenos con dos posibles efectos: el primero para auto facilitar la conducta sexual y el segundo para potenciar las propiedades de recompensa en el apareamiento y eyaculación (Contreras y Agmo, 1993). Para su estudio, se divide en tres fases; precopulatoria, copulatoria y postcopulatoria.

**Fase precopulatoria:** Durante esta fase, el macho persigue a la hembra sexualmente receptiva, olfatea la región anogenital, emite vocalizaciones ultrasónicas, de manera que tanto la hembra como el macho reciben estimulación olfativa, táctil y auditiva (Paredes y Agmo, 1992). La interacción del macho frente a la hembra promueve la liberación de estímulos volátiles como en el caso de la orina y estímulos no volátiles como las feromonas que son captadas por

receptores quimiosensoriales, esto ocurre en el caso del acercamiento al rostro o hacia la región anogenital (Cibrian *et al.*, 2010).

**Fase copulatoria:** Implica la ejecución de posturas y movimientos que permiten la introducción peneana y la expulsión seminal, este patrón motor se presenta cuando el macho está en presencia de una hembra receptiva; para su estudio se divide en tres patrones conductuales que son monta, intromisión y eyaculación (Lucio *et al.*, 2009; Hull *et al.*, 2006). En la figura 1, se muestran dichos patrones respectivamente.



**Figura 1.** Patrón conductual de la cópula en la rata macho. **A.** Monta, **B.** Intromisión, **C.** Eyaculación. (Lucio y Tlachi, 2008).

*Monta.* Se reconoce porque la rata macho queda sobre la hembra, sus regiones pélvicas y perineales apoyadas sobre la grupa femenina. Con las extremidades delanteras sujeta a la hembra y le palpa los flancos. Al mismo tiempo realiza movimientos pélvicos rítmicos alternantes hacia adelante y hacia atrás. Después el macho se desmonta lentamente. La hembra por su parte realiza una lordosis (arqueamiento del dorso que se acompaña de la elevación de la cabeza), justo cuando el macho realiza la palpación y sujeción de los flancos (Hull *et al.*, 2006; Lucio y Tlachi, 2008). El patrón de montas se repetirá cada vez con

más regularidad, si el macho llega a detectar la vagina de la hembra se llevará a cabo una intromisión (Hull *et al.*, 2006).

*Intromisión.* Implica la monta más la inserción del pene en la vagina. El macho realiza un movimiento pélvico de penetración con una durabilidad de 400 ms aproximadamente, se desmonta con rapidez y se autoacicala el pene como se muestra (Guevara *et al.*, 2012; Lucio y Tlachi, 2008). El mayor número de intromisiones anteriores a la eyaculación puede ser un factor importante en la promoción de la fertilidad ya que facilita el transporte de los espermatozoides hacia la hembra (Hull *et al.*, 2006).

*Eyaculación.* Después de una serie repetida de montas e intromisiones se da una intromisión que se caracteriza por presentar un movimiento pélvico profundo, que coincide con la emisión de líquido seminal, que es mantenido durante varios segundos, mientras se presenta elevación de las patas. El desmonte de la hembra es lento y se caracteriza por un movimiento de las patas delanteras (Rodríguez y Fernández, 1995) (Hull *et al.*, 2006; Lucio y Tlachi, 2008; Paredes y Agmo, 1992, Agmo y Paredes 1988).

**Fase postcopulatoria:** Esta fase comprende el periodo refractario absoluto y el relativo. Durante el periodo refractario absoluto, el macho da una apariencia de poca locomoción, también es insensible a cualquier estímulo sexual y es poco responsivo a otros estímulos del medio ambiente. Durante el periodo refractario relativo, el macho empieza a responder los estímulos que lo rodean y usualmente emite vocalizaciones ultrasónicas. El intervalo posteyaculatorio (IPE) comprende el

tiempo que transcurre entre la eyaculación hasta que se presenta la monta o intromisión de la siguiente serie eyaculatoria (Lucio *et al.*, 2009; Hull *et al.*, 2006).

### **Parámetros para evaluar la conducta sexual en la rata macho.**

De acuerdo con el manual de Lucio y Tlachi en 2008 los parámetros se clasifican en temporales y numéricos como se simplifica en la figura 2.

#### **Temporales.**

*Latencia de monta* (LM): Tiempo que transcurre desde que el macho y la hembra entran en contacto hasta que se presenta la primera monta.

*Latencia de intromisión* (LI): Tiempo transcurrido desde la introducción de la hembra a la arena de observación, hasta que se presenta la primera intromisión de prueba.

*Latencia de eyaculación* (LE): Tiempo que transcurre desde la primera intromisión de la serie hasta que se presenta la eyaculación que la da por terminada.

*Intervalo posteyaculatorio* (IPE): Tiempo transcurrido entre una eyaculación y el inicio de una nueva serie, determinado por la siguiente intromisión.

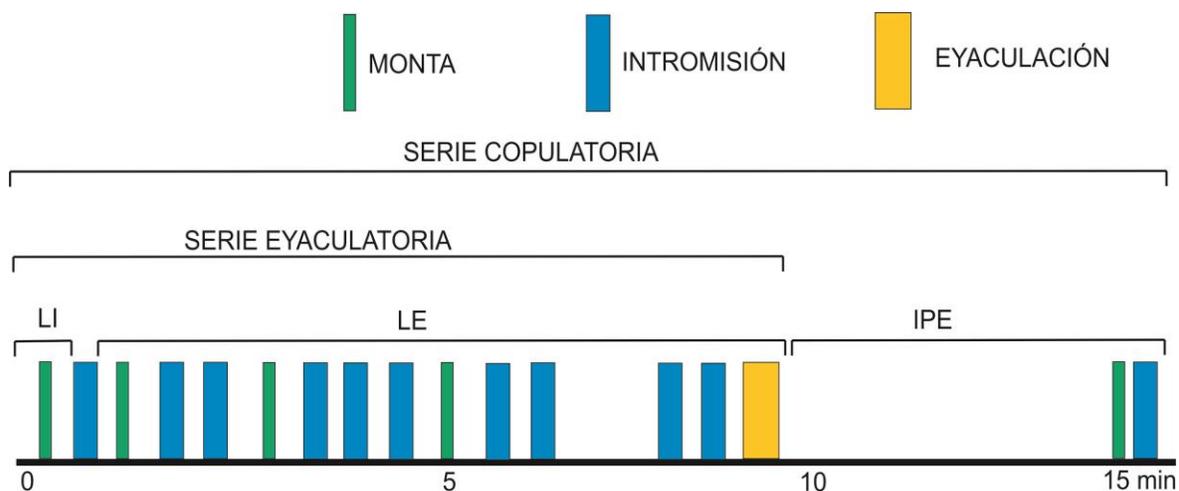
#### **Numéricos**

*Intromisiones*: Número de intromisiones que requieren un animal para alcanzar la eyaculación.

*Montas*: Número de montas que se presentan en una serie antes de la eyaculación.

*Eyaculaciones*: Número de eyaculaciones que preceden a la saciedad sexual (Rodríguez y Fernández, 1995).

### Patrón eyaculatorio de la rata macho.



**Figura 2.** Parámetros conductuales de la cópula de la rata macho. Las montas se muestran en barras de color verde; las intromisiones en barras de color azul y la eyaculación en una barra de color amarillo. LI: Latencia de intromisión, LE: Latencia de eyaculación, IPE: Intervalo posteyaculatorio modificado de Lucio y Tlachi, 2008.

### Estructuras neuroanatómicas relacionadas con la conducta sexual.

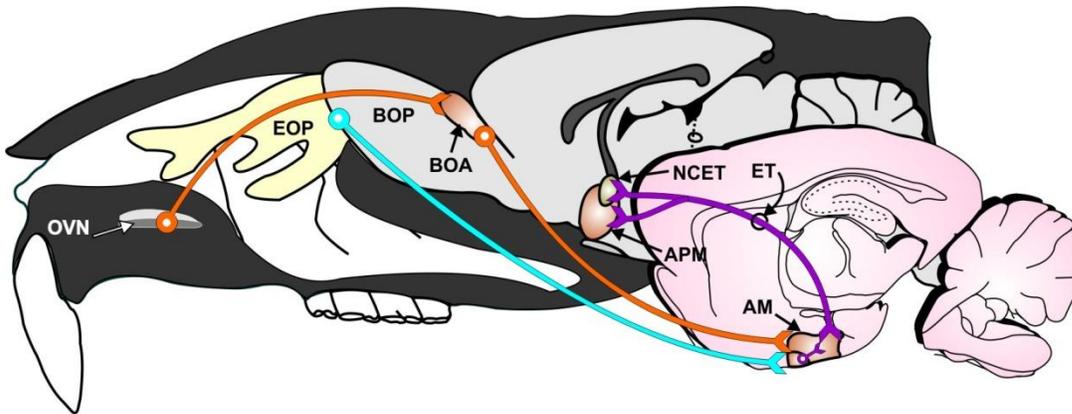
Se han descrito estructuras y áreas en el sistema nervioso central con importancia funcional en la organización de la conducta sexual de la rata macho (Boehm, 2006). La activación de la red neuronal vinculada en la expresión de la conducta sexual requiere de la estimulación del órgano vomeronasal (OVN)

mediante la detección de señales feromonales provenientes de una hembra receptiva. El OVN envía axones al BOA y al BOP (figura 3), del BOA salen fibras que pasan por la MePD, el NCET y llegan a la subdivisión lateral del APM a través de la vía amigdalofugal ventral. El APM es una porción fundamental perteneciente a la vía de proyección del OVN, la cual está involucrada en el procesamiento de señales sexualmente relevantes (feromonas provenientes de una hembra receptiva) que facilitan la conducta reproductiva (Segovia y Guillamón, 1993).

El papel de la participación de las diferentes estructuras cerebrales en el control de la conducta sexual se ha descrito en estudios que han utilizado diferentes estrategias experimentales como la activación del gen *c-fos* así como la expresión de su proteína c-Fos, en estudios de lesiones cerebrales con marcaje de vías anatómicas o de registro de actividad neuronal (Pfaus *et al.*, 2010; Romero *et al.*, 2007; Robertson *et al.*, 1991; Veening *et al.*, 2005; Coolen *et al.*, 1996; Bialy y Kaczmarek, 1996). Debido a que la IR-Fos representa una herramienta de utilidad para correlacionar la importancia de la actividad neuronal con la ejecución de la conducta se destacan aquellas evidencias que muestran un incremento en neuronas inmunopositivas, tras la exposición a un estímulo sexualmente relevante. Estas evidencias, han permitido sugerir al APM, como el centro integrador y regulador de la conducta sexual (Pfaus, 1999; Paredes, 2003).

Larsson y Alhenius en 1999 lesionaron APM en hipotálamo; los resultados los llevaron a sugerir dos mecanismos neurales que regulan el comportamiento sexual de la rata macho, en el cual se involucran estructuras del diencefalo caudal

y mesencéfalo anterior (Giuliano *et al.*, 2012; Hull y Rodríguez, 2009; Larsson y Ahlenius, 1999).



**Figura 3.** Esquema del circuito neuronal vinculado con la conducta sexual del macho, las señales feromonales son percibidas principalmente por el órgano vomeronasal, para transmitir esta información desde la amígdala salen proyecciones hacia el núcleo cama de la estría terminal **NCET** y al área preóptica medial **APM**, órgano vomeronasal **OVN**, bulbo olfatorio principal **BOP**;, bulbo olfatorio accesorio **BOA**, área preóptica medial; **TBOA**, tracto del bulbo olfatorio accesorio; **AM**, amígdala medial (Boehm, 2006).

Para los propósitos de este trabajo a continuación se describen características morfológicas y funcionales de dos áreas fundamentales para el estudio de la conducta sexual masculina.

### **Amígdala medial posterodorsal (MePD)**

La MePD forma parte de los núcleos de la amígdala y es considerada un punto de integración de estímulos y hormonas relacionadas con la conducta sexual. Sus aferencias provienen del BOA y a través de sus eferencias se comunica con el APM, de ésta manera se relaciona con la facilitación de la conducta sexual en la ratona macho (Dhungel *et al.*, 2011; Lehman y Winans, 1982).

Pfaus y colaboradores en el 2001 relacionan al MePD como un área implicada en la excitación sexual y generación de la conducta sexual masculina a través de estudios con lesiones. Tratamientos de sulfato de zinc intranasal pueden dañar la mucosa olfativa sin afectar el sistema vomeronasal, esto provoca una disminución de la cópula y una menor activación de c-Fos en MePD, por lo que se sugiere que la entrada desde el sistema olfativo principal contribuye a la activación de las neuronas de esta área además de la participación del sistema vomeronasal (Dhungel *et al.*, 2011; Fernández y Meredith, 1998; Baum y Everitt, 1992).

### **Área preóptica medial (APM)**

El APM se encuentra entre la porción caudal del quiasma óptico ventral y la comisura anterior, su límite anterior es con la lámina terminal y su borde caudal es el NCET (Paredes, 2003; Simerly y Swanson, 1988; Simerly y Swanson, 1986; Larsson y Ahlenius, 1999). Se ha sugerido como el centro integrador de los mamíferos para el comportamiento de la conducta sexual (Hull y Rodríguez, 2009; Balthazart y Ball, 2007). Estudios previos demuestran que una lesión en el APM inhibe la cópula en la rata macho al ser expuesto a una hembra receptiva (Rodríguez y Pellicer, 2010; Morris *et al.* 2008; Paredes *et al.*, 1993; Baum y Everitt 1992). En contraste, la estimulación eléctrica de esta zona facilita el comportamiento sexual, esto implica una reducción en el número de intromisiones necesarias para lograr la eyaculación (Paredes y Agmo, 1992). Fisiológicamente se ha comprobado la actividad neuronal del APM que está implicada en la culminación de la conducta sexual a través de la proteína c-Fos (Dominguez y Hull, 2005; Agmo y Pfaff, 1999).

## **Modulación opioide de la conducta sexual masculina.**

### **Opioides**

Los péptidos opioides están distribuidos ampliamente en el cerebro, actúan como neuromoduladores de funciones muy diversas relacionadas con el área cerebral en consideración. Estas sustancias activan receptores específicos y son extremadamente potentes en influenciar funciones centrales formando parte importante del sistema neurohormonal (Paredes, 2014; Pfaus *et al.*, 2012; Paredes, 2003; Argiolas, 1999).

El conocimiento del sistema de neuropéptidos de naturaleza opioide se ha desarrollado ampliamente debido a que está asociado con diferentes funciones entre las que se incluyen: analgesia, regulación de funciones gastrointestinales, endocrinas y del sistema nervioso autónomo; funciones relacionadas con recompensa y adicción, en funciones cognitivas como la regulación del aprendizaje y memoria (Akil *et al.*, 1998). Además, está bien documentada la participación del sistema opioide endógeno en la regulación del embarazo, parto y funciones reproductivas en ratas hembra (Argiolas, 1999; Pfaus y Gorzalka, 1987). Los péptidos opioides endógenos se derivan principalmente de cuatro precursores, proopiomelanocortina, proencefalina, prodinorfina y pronociceptina; excepto por la nociceptina todos los péptidos opioides cuentan con una secuencia de un pentapéptido Tir-Gli-Gli-Phe-(Met o Leu) (Ver anexo 1, Cuadro 4) (Fichna *et al.*, 2007).

Con el fin de conocer la participación de los péptidos opioides en el control de la conducta sexual se han administrado agonistas a opioides en diferentes

estructuras cerebrales y por vías diferentes. Hull y colaboradores en 2006 apoyan que los opiáceos y opioides tienen un papel inhibitorio en la conducta sexual, lo cual se basa en las observaciones de los efectos de facilitación que causa la administración de antagonistas a opioides. Holloway en 2012 expone que los opioides tienen un efecto inhibitorio en la conducta sexual de la rata macho. Por otro lado, Parra y colaboradores en 2009 proponen una influencia relacionada a la dosis y al sitio de administración, debido a que en la infusión de EM-1 icv en dosis 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  o 50  $\mu\text{M}$  no se observa influencia inhibitoria significativa, pero la administración de 100  $\mu\text{M}$  provocó un aumento significativo de la latencia de eyaculación en machos sexualmente activos.

### **Endomorfina.**

Las endomorfina son una familia de péptidos que se han aislado a partir de la corteza frontal del bovino. Destacan la EM-1 (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>) y la endomorfina-2 (EM-2) (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>) que tienen una alta afinidad por unirse al MOR. Se han realizado estudios que ponen en evidencia que la EM-1 y la EM-2 están ampliamente distribuidas en el sistema nervioso, incluyendo regiones el núcleo periacueductal, el tálamo, el hipotálamo y la amígdala, que pueden influir en el estado de ánimo y afectivo (Zadina *et al.*, 1997). Farmacológicamente las dos endomorfina son analgésicos potentes y muestran propiedades similares (Goldberg, 1999). Se ha demostrado que la EM-1 tiene un papel en la regulación de la cópula masculina en mamíferos en administración icv en AMP y Am (Parra *et al.*, 2013). Se ha evidenciado en ratas hembra la participación endógena en el APM de la EM-2 localizada en terminales axónicas

en forma de vesículas, proponiendo que este opioide funciona de manera endógena en el APM (Wang *et al.*, 2002).

## **Receptores a opioides**

Los receptores a opioides se activan tanto de forma endógena por péptidos opioides como exógenamente por fármacos opiáceos (morfina). Estudios de clonación de receptores han permitido el descubrimiento de cuatro tipos de receptores a opioides, los mu, kappa, delta y nociceptina/orfanina (Bodnar, 2012; Matuszewich y Dornan, 1992).

Los receptores a opioides mu (MOR) deben su nombre a la unión con el agonista del tipo de la morfina; sus secciones amino y carboxilo terminal son más largas en comparación a la de los demás receptores (Bodnar, 2012). Los ligandos EM-1 y EM-2 altamente selectivos y con gran afinidad por el MOR se aislaron en la década de los '90; inducen una respuesta fisiológica y conductual similar a la generada por otros opioides como las endorfinas; sin embargo, su origen endógeno aún se discute, ya que su precursor proteico no se ha identificado (Fichna *et al.*, 2007). La administración de  $\beta$ -endorfina en diferentes especies como la rata, inhibe la conducta copulatoria (Holloway, 2012; Bodnar, 2012).

Los receptores a opioides delta (DOR) cuando se les administra un agonista favorecen la conducta sexual en estudios realizados en rata, este efecto es revertido por la naloxona (Pfaus y Gorzalka, 1987). Una gran variedad de ensayos *in vitro* e *in vivo* han propuesto subtipos de DOR con una alta afinidad por las encefalinas (Bodnar, 2012; Waldhoer *et al.*, 2004; Moallem *et al.*, 2012).

Los receptores a opioides kappa (KOR) deben su nombre a que poseen mayor afinidad por la ketociclazocina, que es un agonista opioide (Holloway, 2012). La clonación de KOR permitió identificar que tienen una alta afinidad por péptidos endógenos como la dinorfina A (Bodnar, 2012; Moallem *et al.*, 2012; Waldhoer *et al.*, 2004)

Del receptor a nociceptina solo se conoce que está presente en 5 mamíferos; humano, rata, ratón, cerdo y conejillo de indias. Tiene una alta afinidad por la dinorfina A (Bodnar, 2012; Moallem *et al.*, 2012).

Con el fin de conocer la participación de los receptores a péptidos opioides endógenos en el control de la conducta sexual, se han administrado agonistas a opioides en diferentes estructuras cerebrales y se han observado los resultados tras la aplicación de métodos inmunohistoquímicos (Waldhoer *et al.*, 2004; Matuszewich y Dornan, 1992; Sinchak y Micevych, 2003; Arttamangkul *et al.*, 2006).

Coolen y colaboradores en el 2004 sugieren que el comportamiento sexual es un estímulo biológico que libera péptidos opioides endógenos, que activan MOR en el APM en ratas macho y la endocitosis del MOR se utiliza como marcador para demostrar la participación y actividad del receptor el cuál es inducido por su ligando.

## **Internalización de los receptores opioides.**

A nivel de la membrana celular de las neuronas los receptores a opioides pueden acoplarse a proteínas  $G_i/G_o$  y cuando un ligando se une produce cambios hidrofóbicos e hidrofílicos. Una de las características de estos receptores es que se activan tanto por péptidos nativos como por no nativos. El cambio conformacional provoca interacción de los dominios intracelulares transmitiéndose la señal de transducción. Los canales de calcio y potasio también son modulados por la despolarización de la membrana una vez que se produce la activación de la proteína G, la subunidad  $\alpha_i$  provoca la inhibición de la adenilato ciclasa, enzima unida a la cara interna de la membrana celular, por lo que se produce una disminución de la concentración de AMP cíclico intracelular, modulando las adenilato ciclasa I, V, VI y VIII; por otro lado, el dímero  $\beta\gamma$  activa los subtipos II, IV y VII (Waldhoer *et al.*, 2004; Keith *et al.*, 1996). La desensibilización por agonistas se lleva a cabo por la fosforilación de los dominios intracelulares de los receptores. La cinasa dependiente de AMP cíclico, proteína cinasa C y proteína cinasa II calcio-calmodulina dependiente son algunas de las kinasas involucradas en la desensibilización de la neurona (Keith *et al.*, 1996; Dohlman *et al.*, 1991).

Cuando se produce una exposición prolongada a ligandos se degrada el receptor; esto causa una desensibilización en la neurona y cuando la exposición es de tiempos cortos a su ligando se causa una rápida desaparición de receptores de la superficie celular neuronal, como resultado de su endocitosis. El mecanismo exacto de internalización no es bien conocido, sin embargo, se ha sugerido que la internalización de los receptores se lleva a cabo por la vía clásica de endocitosis

(Keith *et al.*, 1996). La ruta principal de internalización de los receptores acoplados a proteínas G es mediante la vía de fosas y vesículas recubiertas de clatrina para formar endosomas. Cuando son ácidas las condiciones de los endosomas, el ligando se separa del receptor y éste es reciclado a la superficie neuronal o bien es degradado por el sistema vesicular (Waldhoer *et al.*, 2004. Dohlman *et al.*, 1991)

### **Los opioides en la conducta sexual masculina.**

La ejecución de la conducta sexual masculina es considerada una conducta motivada en la que se liberan péptidos opioides endógenos entre otros mensajeros químicos. La región más crítica encéfalica para la conducta sexual es el APM situada en el hipotálamo rostral (Bodnar, 2012; Arttamangkul *et al.*, 2006; Sinchak y Micevych, 2003; Matuszewich y Dornan, 1992). Se ha reportado que la administración de opioides en el tercer ventrículo induce la internalización de los receptores y facilita la conducta copulatoria, que finalmente induce un estado de recompensa (Wang *et al.*, 2002). Los opioides pueden mediar estados recompensantes y su bloqueo afecta la adquisición de respuestas condicionadas sexualmente (Bodnar, 2012). Coolen y colaboradores en 2004 afirman que la activación del MOR puede influenciar el inicio del intervalo posteyaculatorio y a la saciedad sexual probablemente porque su liberación es más importante durante este periodo, lo cual favorece al establecimiento del estado recompensante. Holloway en el 2012 en su revisión llega a la conclusión de que los opioides son moduladores de las respuestas sexuales en conductas de condicionamiento apetitivas y eso atenúa los efectos que tienen los antagonistas opiáceos durante la

cópula. Van Fourth y colaboradores en 1995 proponen una alteración de la conducta por la administración de opioides en APM, lo que causa una reacción inhibitoria al ser administrada en la región ventricular media, observada al inicio de la conducta y en la fase eyaculatoria. Recientemente, se ha demostrado que la conducta sexual promueve la activación de receptores opioides en el área tegmental ventral, ya que la eyaculación induce un incremento en el número de MOR internalizados en las neuronas gabaérgicas de esta área (Balfour *et al.*, 2004). En esta investigación se visualizaron los endosomas mediante microscopia confocal, y la cuantificación de estas partículas proporcionó la medida indirecta de la liberación del péptido opioide endógeno marcado en la neurona. La infusión de EM-1 en el APM en ratas hembra, sugiere que favorece la conducta sexual femenina y propone a la EM-1 como péptido opioide endógeno que puede inducir la activación de MOR (Sinchak y Micevych, 2001). Se ha especulado sobre la posible participación de diferentes receptores opioides en la regulación conductual con efectos diferentes, basados en inyecciones icv se ha mencionado que la activación con alta afinidad por el receptor  $\mu_1$  que inhibe la conducta sexual a diferencia de los receptores de baja afinidad como lo son los  $\mu_2$  que la estimulan (Matuszewich y Dornan, 1992; Band y Hull 1990; Pfaus y Gorzalka, 1987)

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El conocimiento de la participación del sistema opioide en la modulación de la conducta sexual masculina ha sido abordado bajo la perspectiva de la acción de diferentes ligandos a este sistema de comunicación neural como son las encefalinas,  $\beta$ -endorfina, opiáceos sintéticos así como diferentes antagonistas al sistema opioide (Bodnar, 2012). Esta evidencia ha demostrado que los opioides pueden inhibir la conducta sexual en relación directa a las características bioquímicas del opioide, a la dosis y sitio de administración. En experimentos anteriores en el laboratorio de Neuroanatomía Funcional de la Facultad de Medicina de la UNAM se ha demostrado que la EM-1 modula los componentes apetitivos de la conducta sexual en la rata macho cuando este péptido es administrado directamente en el APM y previo al inicio de la conducta sexual. Asimismo, la administración en MePD modula la consumación de la cópula (Parra *et al.*, 2013; Parra *et al.*, 2009). Estos resultados sugieren que la EM-1 puede ser un péptido opioide endógeno que participa en la modulación conductual de la rata macho, a través de la internalización del MOR. Así, resulta pertinente demostrar de manera fisiológica y neuromorfológica que la EM-1 produce esta activación tanto por la ejecución de la cópula como por el estímulo farmacológico de este péptido vía icv en áreas importantes para su construcción.

## **HIPÓTESIS**

La administración vía icv de la EM-1 induce endocitosis del MOR en el APM y MePD en la rata macho de forma similar a lo que ocurre tras la cópula con la liberación de ligandos endógenos.

## **OBJETIVO GENERAL**

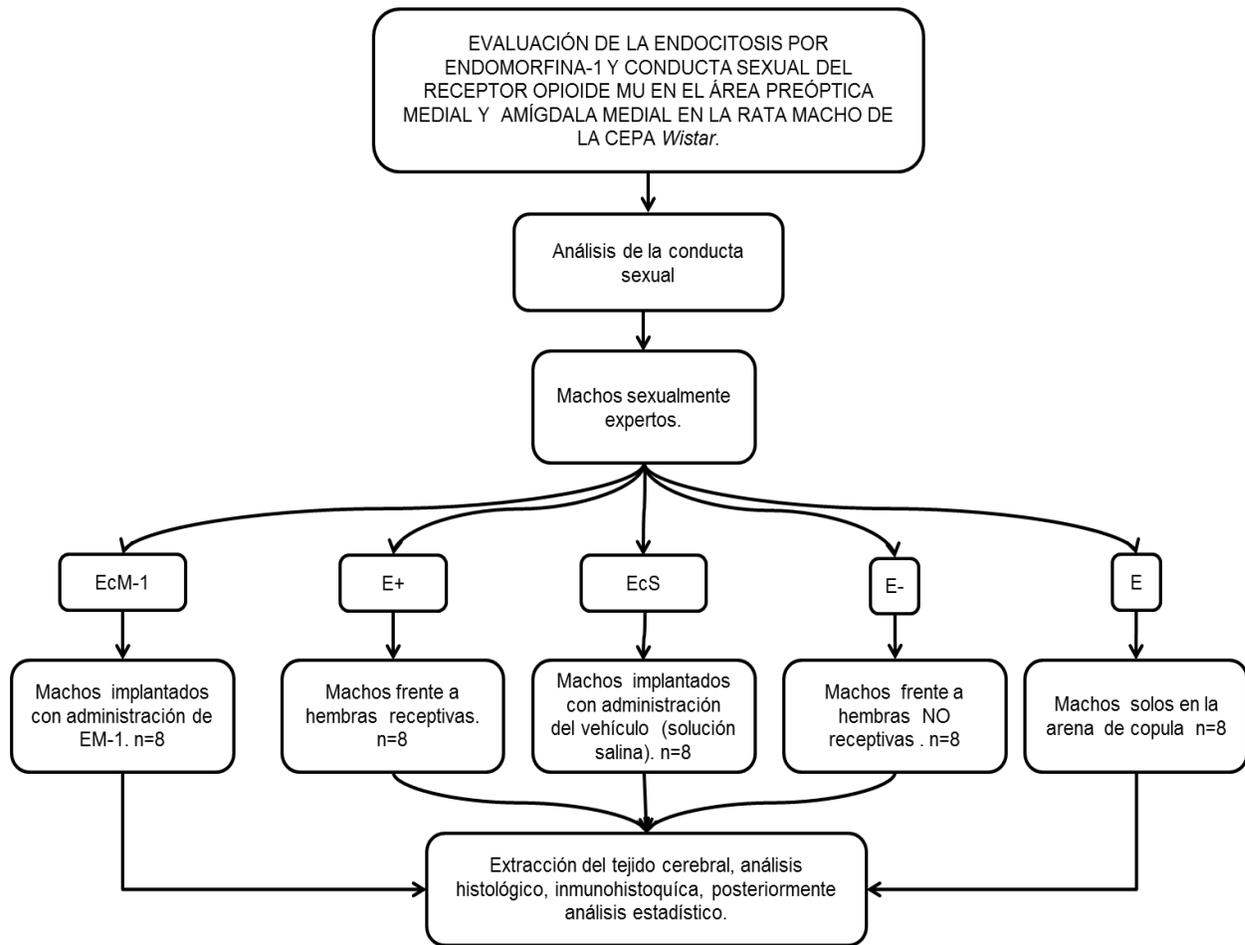
Evaluar la endocitosis del MOR por administración de la EM-1 vía icv en el APM y MePD de la rata macho.

## **OBJETIVOS PARTICULARES.**

- Cuantificar la expresión de c-Fos y MOR en el APM y MePD en ratas macho sexualmente expertas tras la administración de EM-1.
- Cuantificar la expresión de c-Fos y MOR en el APM y MePD en ratas macho sexualmente expertas tras la conducta sexual.
- Demostrar la activación neuronal específica en subregiones del APM tras la administración de EM-1.
- Demostrar la activación neuronal específica en subregiones del APM tras la conducta sexual.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

Con el objetivo de determinar la endocitosis del MOR por la administración de EM-1 vía icv, se distribuyeron 46 ratas macho de la cepa *wistar* expertas sexualmente en cinco grupos. El grupo EcEM-1 fue implantado con una cánula icv y se le administro EM-1 ; el grupo E+ se expuso a una hembra receptiva, el grupo EcS fue implantado icv y se le administró solución salina, el grupo E- fue expuesto en la arena de cópula a hembras no receptivas y finalmente el grupo E permaneció solo en la arena de cópula en ausencia de estímulo sexual (ver figura 4). La evaluación morfológica para la IR-Fos e IR-MOR, se realizó utilizando grupos independientes con una n=8. Con el fin de correlacionar los hallazgos morfológicos de la expresión del MOR se analizó la conducta copulatoria en cada uno de los grupos correspondientes que fueron expuestos a la actividad sexual.



**Figura 4.** Diagrama del diseño experimental.

## SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODO

### **Animales.**

Se utilizaron 46 ratas machos adultos de la cepa *wistar* de 250 a 300 g. criadas en el bioterio general de la Facultad de Medicina de la UNAM. Los sujetos se colocaron en cajas de estancia de manera individual, bajo un ciclo invertido de luz/oscuridad 12:12 (luz 19:00 h), la temperatura de 22°C, comida y agua *ad libitum*. Se utilizaron ratas hembra sexualmente receptivas, para inducir la conducta sexual de los machos. Para este propósito las hembras fueron ovariectomizadas y estimuladas con hormonas esteroideas, benzoato de estradiol (Sigma Chemical Company St. Louis, MO, USA) en dosis de 2.5 µg 48 h antes de la prueba y 1 mg de progesterona de 4 a 6h antes de la sesión conductual (Sigma Chemical Company St. Louis, MO, USA). Todo esto bajo aprobación del comité de Bioética y manejo de animales de la Facultad de Medicina y de acuerdo a la norma de uso y manejo de animales para el DF (NOM-062-ZOO-1999).

### **Entrenamientos en la de conducta sexual.**

Con el fin de que los machos adquirieran experiencia sexual, todos los sujetos incluidos en el experimento realizaron pruebas conductuales en arenas circulares de plástico (50x60cm.), en la fase oscura del ciclo, bajo iluminación roja para ser observados y video grabados. Los machos fueron expuestos a hembras receptivas y se les permitió copular durante cuatro sesiones de 30 minutos distribuidas en dos sesiones por semana. Aquellos machos que alcanzaron por lo

menos una serie copulatoria en 30 min en dos sesiones consecutivas se les consideró machos expertos y fueron seleccionados y distribuidos al azar en los diferentes grupos.

### **Análisis de la conducta sexual.**

Se colocó al animal en la arena de cópula, se grabó en video para su posterior análisis, el análisis se hizo mediante observación y con ayuda del software OMNI\_ALVA OA ConduRep, software para el registro de la conducta Reproductiva, 2006. Los parámetros utilizados fueron:

*Frecuencia de Montas (MF)*. Número de eventos de monta para la serie.

*1er Latencia de Monta (PEI/M)*. Tiempo relativo en el cuál se da la primera monta.

*1er Latencia de Monta-Eyaculación (EL/M)*. Tiempo relativo entre el evento de monta y el de eyaculación.

*Frecuencia de intromisión (IF)*. Numeros de eventos de intromisión para la serie.

*1er Latencia de Intromisión (PEI/I)*. Tiempo relativo en cuál se da la primera intromisión.

*1er Latencia de Intromisión-Eyaculación. (EL/I)*. Tiempo relativo que transcurre desde el evento de la intromisión hasta la eyaculación.

*Media Inter-Intromisión (III)*. Es el promedio de los intervalos de intromisión.

*Tasa de aciertos (HR)*. Utiliza la fórmula  $((I+E) / (M+I+E))$  donde I, M y E es el número total de eventos de intromisión, montas y eyaculación de la serie respectivamente.

*Índice de intromisión (I/M+I)*. Utiliza la fórmula  $(I/(M+I))$  donde las I y las M es el número total de eventos de intromisiones y montas de la serie respectivamente.

*Intervalo posteyaculación (PIC)*. Tiempo transcurrido entre el evento de eyaculación y el evento de la siguiente monta o intromisión según sea el caso.

**Cuadro 1. Parámetros de la conducta sexual de la rata macho expuestos a hembras receptoras.**

| Ratas macho | MF    | PEI/M (seg.) | EL/M (seg) | IF    | PEI/I (Seg) | EL/I   | III   | MDII  | HR    | I/M+1 | PIC    |
|-------------|-------|--------------|------------|-------|-------------|--------|-------|-------|-------|-------|--------|
| 1           | 3     | 10           | 567        | 41    | 19          | 590    | 13    | 11    | 0.93  | 0.93  | 223    |
| 2           | 4     | 10           | 661        | 44    | 11          | 660    | 15    | 14    | 0.92  | 0.92  | 378    |
| 3           | 6     | 12           | 592        | 38    | 24          | 568    | 15    | 14    | 0.87  | 0.86  | 443    |
| 4           | 2     | 6            | 662        | 25    | 9           | 659    | 25    | 16    | 0.93  | 0.93  | 412    |
| 5           | 3     | 21           | 497        | 13    | 55          | 463    | 36    | 37    | 0.82  | 0.81  | 343    |
| $\bar{X}$   | 3.6   | 11.8         | 595.8      | 32.2  | 23.6        | 588    | 20.8  | 18.4  | 0.894 | 0.89  | 359.8  |
| Error       | ±0.68 | ±2.50        | ±31.02     | ±5.79 | ±8.30       | ±36.23 | ±4.34 | ±4.72 | ±0.02 | ±0.02 | ±38.06 |

El parámetro conductual se mide (Cuadro 1) con el fin de corroborar que las ratas macho tienen al menos una eyaculación en un intervalo de 30min., para poder tomarlas en cuenta y repartirlas aleatoriamente en los grupos que se utilizaron para esta investigación.

#### **Administración vía icv de EM-1.**

La cirugía estereotáxica se realizó a n=22 machos pertenecientes a los grupos EcM-1 y EcS (figura 4). La cirugía se desarrolló bajo anestesia profunda utilizando una mezcla de Xilacina (Procin) y Ketamina (Anesket) respectivamente en las siguientes dosis, Ketamina 12mg/Kg, Xilacina 95 mg/Kg i.p. Posteriormente

se les realizó un implante unilateral en tercer ventrículo con las coordenadas según Ashwell y Paxinos en 2008 dirigido al tercer ventrículo (AP-04; V=7 mm). Ocho días después de la cirugía los sujetos se pusieron a realizar una sesión conductual copulatoria con el fin de verificar la reanudación de la conducta basal.

Con el propósito de seguir los objetivos propuestos el trabajo se desarrolló en dos fases.

### **Fase 1. Efecto de la EM-1 en el APM y MePD administrada vía icv.**

Sujetos con implante icv fueron incluidos en esta fase. Una vez transcurrido un periodo de recuperación post-cirugía de aproximadamente 8 días se verificó la actividad copulatoria, aquellos sujetos que realizaron una serie copulatoria, se les consideró recuperados y aptos para continuar con el experimento lo cual ocurrió entre una o dos sesiones más de observación, con un tiempo de 30 min por cada observación. Antes de iniciar su siguiente sesión conductual se les administró icv Em-1 100  $\mu$ M en un volumen de 0.5  $\mu$ l (EcM-1). Un grupo similar recibió solución salina con un volumen de 0.5  $\mu$ l (EcS). Los machos permanecieron en su caja de estancia por un periodo de 1 h, transcurrido este tiempo se sacrificaron mediante la aplicación de una dosis letal de pentobarbital sódico (65 mg/ml). Para la obtención del encéfalo se les realizó perfusión intracardiaca con 400 ml de solución salina seguido de 500 ml de paraformaldehído al 4% diluida en una solución amortiguadora con un pH de 7.3. El encéfalo se conservó en

paraformaldehído y en refrigeración hasta continuar con los siguientes tratamientos inmunohistoquímicos.

## **Fase 2. Evaluación de la expresión de MOR en el APM y MePD de animales sexualmente expertos.**

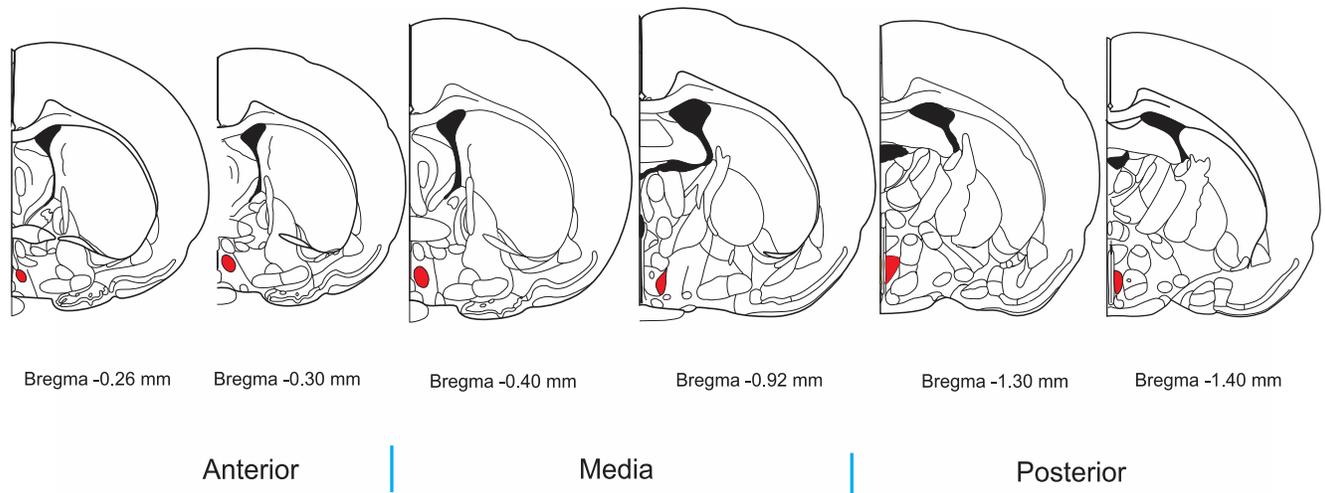
Se utilizaron veinticuatro machos sexualmente expertos y se asignaron aleatoriamente en tres grupos. En un grupo los sujetos fueron expuestos a una sesión de conducta copulatoria frente a una hembra receptiva dentro de la arena de cópula con una duración de 30 min (E+), otro grupo de sujetos fué colocado en la arena de cópula frente a una hembra no receptiva (E-) por un tiempo semejante al grupo anterior y finalmente un último grupo (E) donde permanecieron solos en la arena durante 30 min. Transcurrido este tiempo, los sujetos de estos grupos fueron sacrificados mediante la aplicación de una dosis letal de pentobarbital sódico (65 mg/ml) y fueron perfundidos con 400ml de solución salina seguido de 500ml de paraformaldehído al 4%, una solución amortiguadora con pH de 7.3. El encéfalo fue crío protegido en sacarosa al 30% y puesto en refrigeración hasta continuar con los siguientes tratamientos inmunohistoquímicos.

### **Preparación del tejido**

Tras la prueba conductual y fijación por perfusión intracardiaca, los cerebros fueron removidos del cráneo, puestos en sacarosa al 30% y conservados a 4°C por 3 días hasta su precipitación. Se realizaron cortes coronales en un micrótomo de congelación (American optical crio-cut II) con un espesor de 40µm.

## Muestreo del APM y MePD.

Para la obtención de los cortes se realizaron cortes coronales que incluyeron al APM (Bregma- 0.26 mm a -1.40mm), subregión anterior; Bregma - 0.26 a -0.30 mm; subregión media, Bregma-0.40 a -0.92 mm y subregión posterior: Bregma-1.30 mm a -1.40 mm, (Ashwell y Paxinos, 2008) como se muestra en la Figura 5. En MePD (Bregma -3.60mm) (figura 6) fueron distribuidos en pozos en serie de cuatro. Una serie completa de los cuatro pozos se destinó al montaje de las inmunohistoquímicas de control, c-Fos, MOR y finalmente para la tinción de Nissl.



**Figura 5.** Sitios de la evaluación de inmunohistoquímica para el APM de acuerdo al atlas de Ashwell y Paxinos en 2008.



Bregma -3.60 mm

**Figura 6.** Sitios de la evaluación de inmunorreactividad en la MePD de acuerdo al atlas de Ashwell y Paxinos en 2008.

### Conteo neuronal

Se contabilizó el número de neuronas IR-Fos y al MOR en el APM y en la MePD (Ashwell y Paxinos 2008). Las imágenes de los cortes teñidos con Nissl fueron utilizados para corroborar la ubicación de las áreas correspondientes a las regiones y subregiones ya señaladas. Una vez seleccionada la región de interés, se procedió a digitalizar las imágenes a un aumento de 40x. Cada imagen fue digitalizada en Image-Pro Plus (version 6.0. 2006). La proporción de área medida en el APM subregión anterior  $48738 \mu^2$ , subregión media  $54024.7 \mu^2$  y el subregión posterior  $47837.8 \mu^2$ . Se realizó el conteo automatizado de las marcas correspondientes a la IR-Fos y en su caso al MOR. Para evitar los falsos positivos de las neuronas con inmunorreactividad, se consideró el criterio de eliminar en el conteo aquellas marcas con valor igual al nivel basal de gris en cada imagen que correspondían al fondo de reacción inespecífico para la inmunohistoquímica, se utilizó el valor de gris de 10 puntos al azar dentro del área de conteo para obtener el valor promedio basal de marca inespecífica.

Para la identificación del receptor internalizado se tomó en base el criterio publicado en el trabajo de Coolen y colaboradores en 2004, en donde se consideraron neuronas con IR a MOR a aquellas que presentaron la marca de tres receptores internalizados.

### **Identificación del sitio de inyección con la tinción con Nissl.**

Para observar que el sitio de inyección fuera el correcto se realizó la técnica de tinción con Nissl. Los cortes del tejido se lavaron 3 veces por 15 minutos en solución amortiguadora al 0.1M, pH 7.3. Posteriormente, el tejido se montó en portaobjetos gelatinizados, se lavaron los cortes en agua destilada 3 veces por 10 minutos, fueron teñidas con violeta de cresilo al 1% por 5 a 10 minutos. El tejido se deshidrató con alcoholes graduales (etanol al 70%, etanol alcohol-xilol por 5 min y xilol por 5 min, posteriormente se montaron con resina sintética (HYCEL), se utilizaron cubreobjetos del No.1 Corning.

### **Inmunohistoquímica para c-Fos.**

Los cortes del tejido se lavaron 3 veces por 10 minutos en solución de amortiguadora al 0.1N (PBS), pH 7.3. Inmediatamente se bloqueó la peroxidasa endógena con la solución de peróxido de hidrogeno al 3% con PBS por 30 min, se hicieron tres lavados con PBS por 10 minutos cada uno, a continuación se incubaron durante una noche a 4°C con el anticuerpo c-Fos humano elaborado en ratón (c-Fos sc52 mouse polyclonal IgG Santa Cruz) a una dilución de 1:2000. Se bloqueó con suero de cabra al 1% y tritón X-10% (PBSGT), al día siguiente se lavó el exceso de anticuerpo primario con 3 lavados en PBS por 10 minutos cada uno,

por consiguiente se incubó con el anticuerpo secundario de cabra dirigido a conejo acoplado a Biotina (Vector kit abc vectastain pk-6200) durante 120 min a temperatura ambiente. Enseguida se retiró el excedente de anticuerpo secundario con 3 lavados por 10 minutos cada uno en PBS, después los cortes fueron incubados usando un kit de complejo enzimático Avidina-Biotina Peroxidasa (Vector kit abcvectastain pk-6200) por 120 minutos. Posteriormente, se retiró el exceso de la solución AB con 3 lavados en PBS por 10 min en cada cambio. Finalmente para revelar la marca, los cortes se incubaron por 6 minutos en una solución de 10 mg de DAB (3-3' Diaminobenzidina) disuelta en 25 ml de PBS, 250 ml de NiSO<sub>4</sub> al 3% y 5 ml de H<sub>2</sub>O al 30%. Como control negativo no se incubó con el anticuerpo primario un corte de cerebro en cada grupo experimental.

Posteriormente se montaron los cortes en portaobjetos y se dejaron secar a temperatura ambiente, se cubrieron con resina sintética (HYCEL). Las observaciones se realizaron encaminadas a hacer un mapeo de la distribución de la IR-Fos como un índice de la actividad neuronal en AMP y MePD.

### **Inmunohistoquímica para MOR**

Los cortes del tejido se lavaron 3 veces por 10 minutos en solución de PBS al 0.1N, pH 7.3 inmediatamente se bloqueó la peroxidasa endógena con la solución de peróxido de hidrogeno al 3% con PBS por 30 minutos, a continuación se hicieron tres lavados con PBS por 10 min cada uno, se incubaron con el anticuerpo primario contra MOR hecho en conejo, durante una noche a una temperatura de 4°C (Anti-Opioid Receptor Antibody,  $\mu$ , painAB5511) a una dilución de 1:2000. Se bloqueó en suero de cabra. Transcurrido este tiempo se lavó el

exceso de anticuerpo primario, 3 lavados con PBS por 10 min cada uno, a continuación se incubaron con el anticuerpo secundario de cabra dirigido a conejo acoplado a Biotina (Vector kit abc vectastain pk-6200) durante 120 min a temperatura ambiente. Se retiró el excedente de anticuerpo secundario con 3 lavados por 10 min cada uno en PBS, después los cortes fueron incubados usando un kit de complejo enzimático Avidina-Biotina Peroxidasa (Vector kit abc vectastain pk-6200) por 120 minutos. Posteriormente se retiró el exceso de la solución AB con 3 lavados en PBS por 10 min en cada cambio. Finalmente para revelar la marca, los cortes se incubaron por 3 minutos en DAB (3-3' Diaminobenzidina), como control negativo no se incubó con el anticuerpo primario un corte de cerebro en cada grupo experimental.

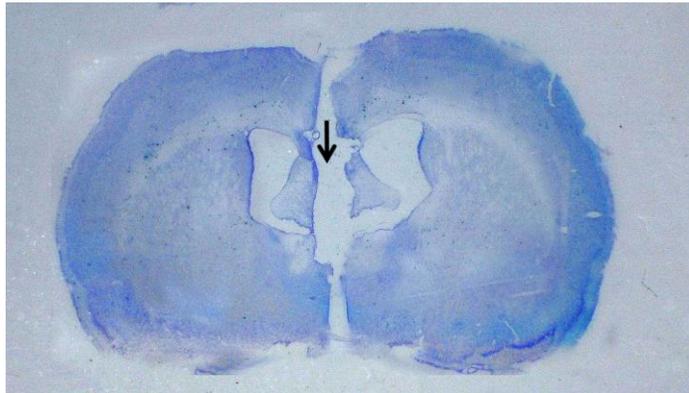
Posteriormente se montaron los cortes en portaobjetos y se dejaron secar a temperatura ambiente, se cubrieron con resina sintética (HYCEL). Para su posterior observación se utilizó un microscopio (Olimpus CH30), las imágenes se capturaron utilizando un sistema de digitalización Image Pro. Las observaciones se hicieron encaminadas a hacer un mapeo de la marca de endosomas en neuronas localizadas en el APM y MePD utilizando el criterio descrito por Coolen y colaboradores 2004.

Se realizó un análisis estadístico para comparar en las diferentes áreas las neuronas con IR-Fos entre los grupos EcEM-1, E+, EcS, E- y E. así como la internalización del MOR, por lo que se contó el número de neuronas con internalización de endosomas, en la prueba de Levene se verificó la igualdad de varianzas en las muestras (homogeneidad de varianzas) ( $p > 0.05$ ) con una prueba de Shapiro-Wilk para corroborar la normalidad en las muestras ( $p > 0.05$ ),

posteriormente se realizó ANOVA de un factor para cada una de las áreas del APM y de MePD con prueba de Tuckey. El análisis estadístico se realizó en el programa SPSS IBM 19.

## RESULTADOS

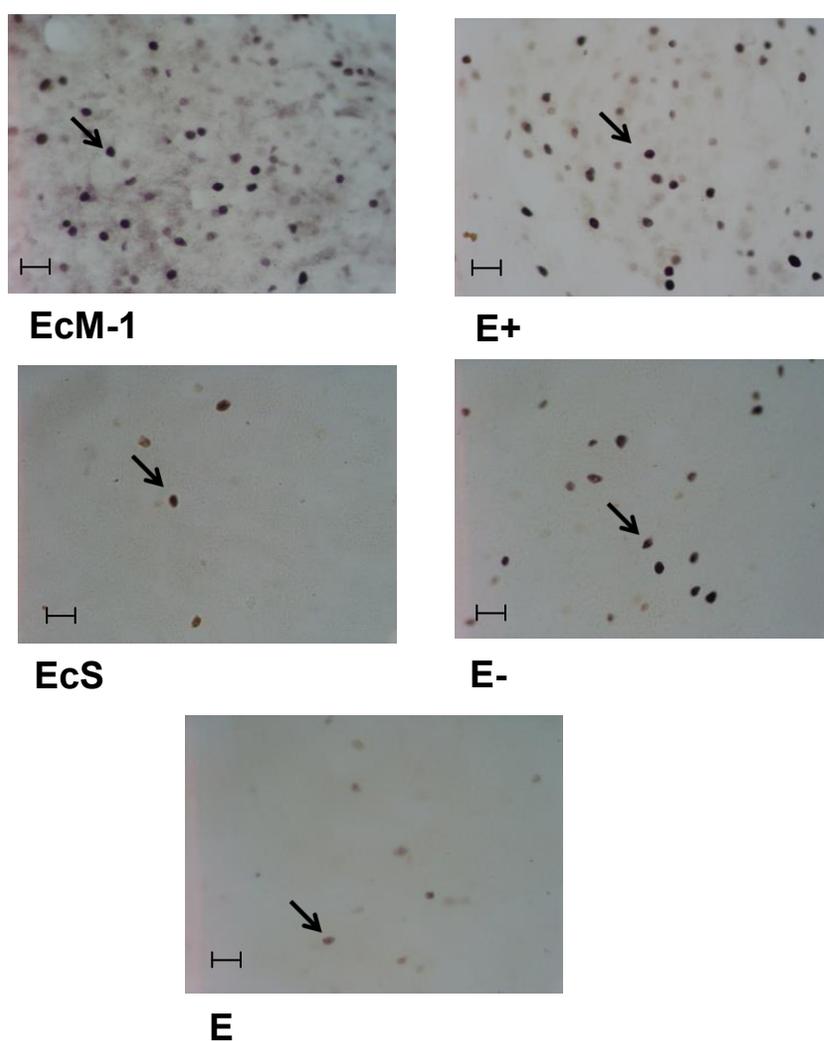
Para los grupos con implante en tercer ventrículo, EcM-1 y EcS, se corroboró la posición de la cánula haciendo la revisión seriada de los cortes coronales del cerebro con Nissl. En la figura 6 se muestra un ejemplo que ilustra el sitio de inyección de los sujetos implantados dentro de las coordenadas ya señaladas anteriormente en tercer ventrículo. Fueron descartados 6 sujetos al no cumplir los criterios de inclusión del experimento por la posición de la cánula o bien porque no recobraron su actividad copulatoria post-cirugía.



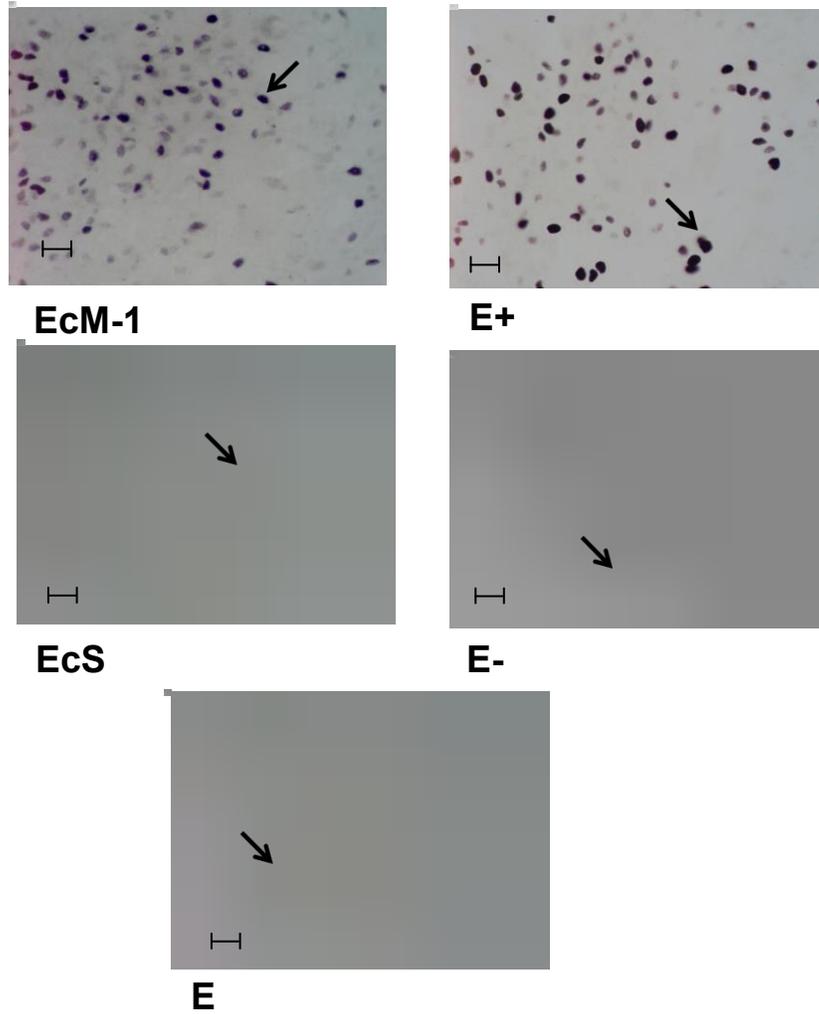
**Figura 6.** Fotomicrografía de corte de cerebro que representa el implante de la cánula en tercer ventrículo con tinción de Nissl, la flecha muestra el trayecto de la cánula por el tercer ventrículo para llegar al sitio de inyección.

## IR-Fos en AMP

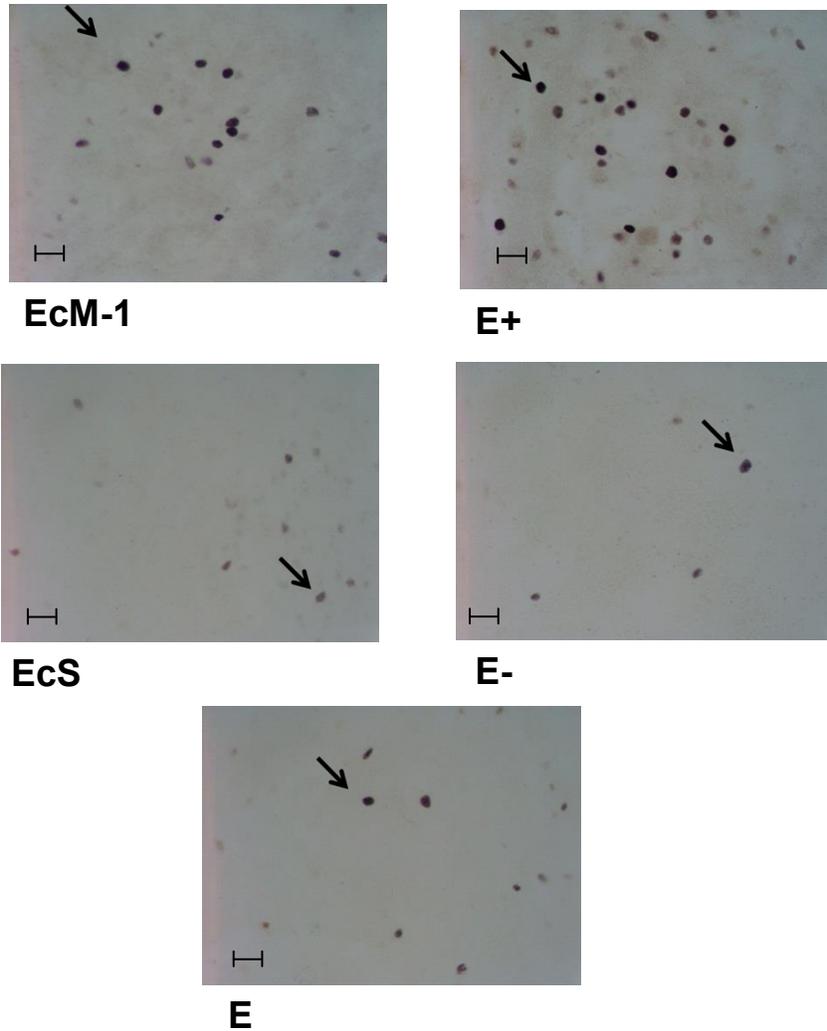
En las figuras 7, 8 y 9 se muestran ejemplos de IR-Fos en cortes coronales representativos de la subregión anterior, media y posterior del AMP, correspondientes a los diferentes grupos: EcM-1, E+, EcS, E- y E. El análisis estadístico mostró diferencias significativas en los grupos EcM-1 y E+ frente al resto de los grupos en las tres porciones del APM.



**Figura 7. Fotomicrografías representativas del APM subregión anterior. IR-Fos de los grupos (EcM-1, E+, EcS, E- y E). Las flechas señalan neuronas con IR-Fos. Escala de barra 20  $\mu$ m. 40X.**

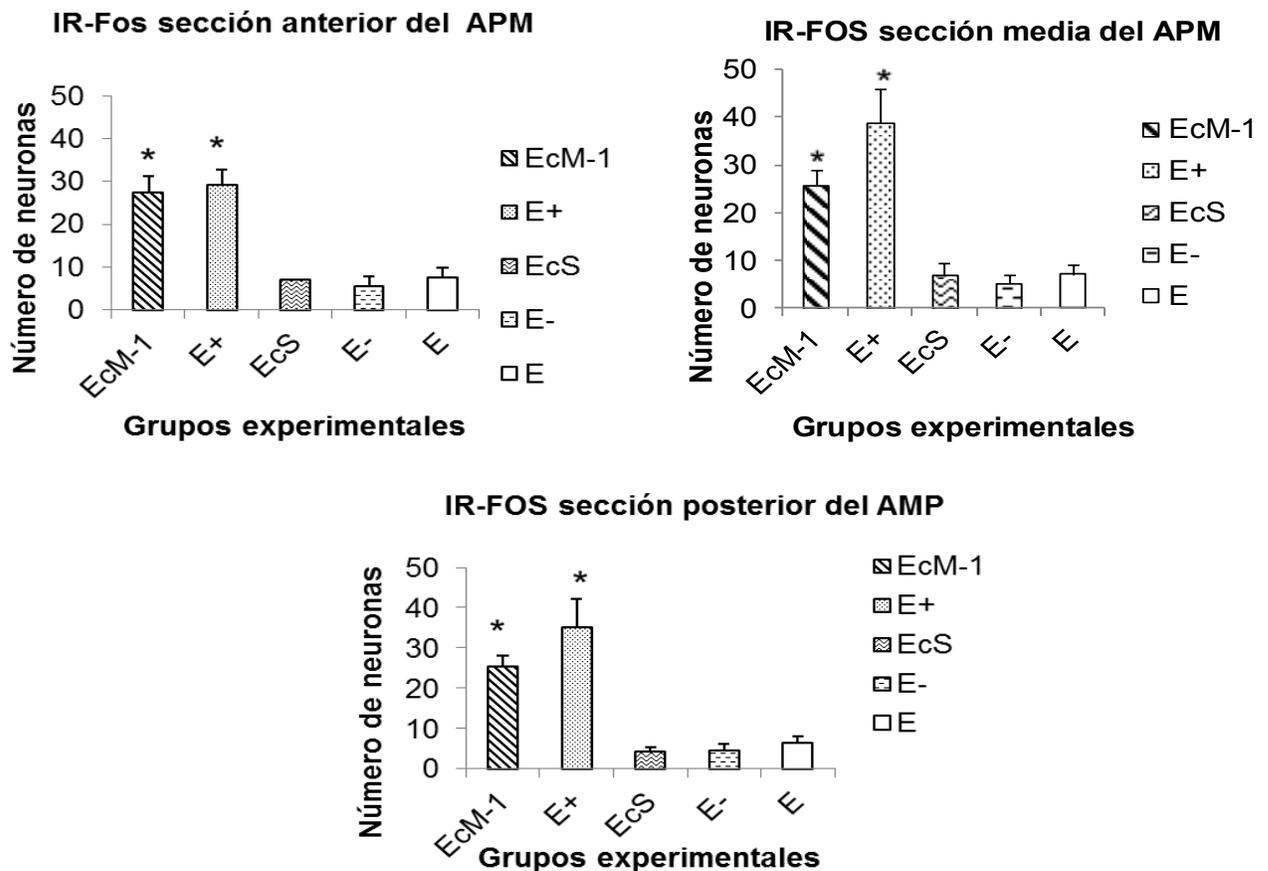


**Figura 8. Fotomicrografías representativas del APM subregión media. IR-Fos de los grupos (EcM-1, E+, EcS, E- y E). Las flechas señalan neuronas con IR-Fos. Escala de barra 20  $\mu$ m. 40X.**



**Figura 9. Fotomicrografías representativas del APM subregión posterior. IR-Fos de los grupos (EcM-1, E+, EcS, E- y E). Las flechas señalan neuronas con IR-Fos. Escala de barra 20  $\mu$ m. 40X.**

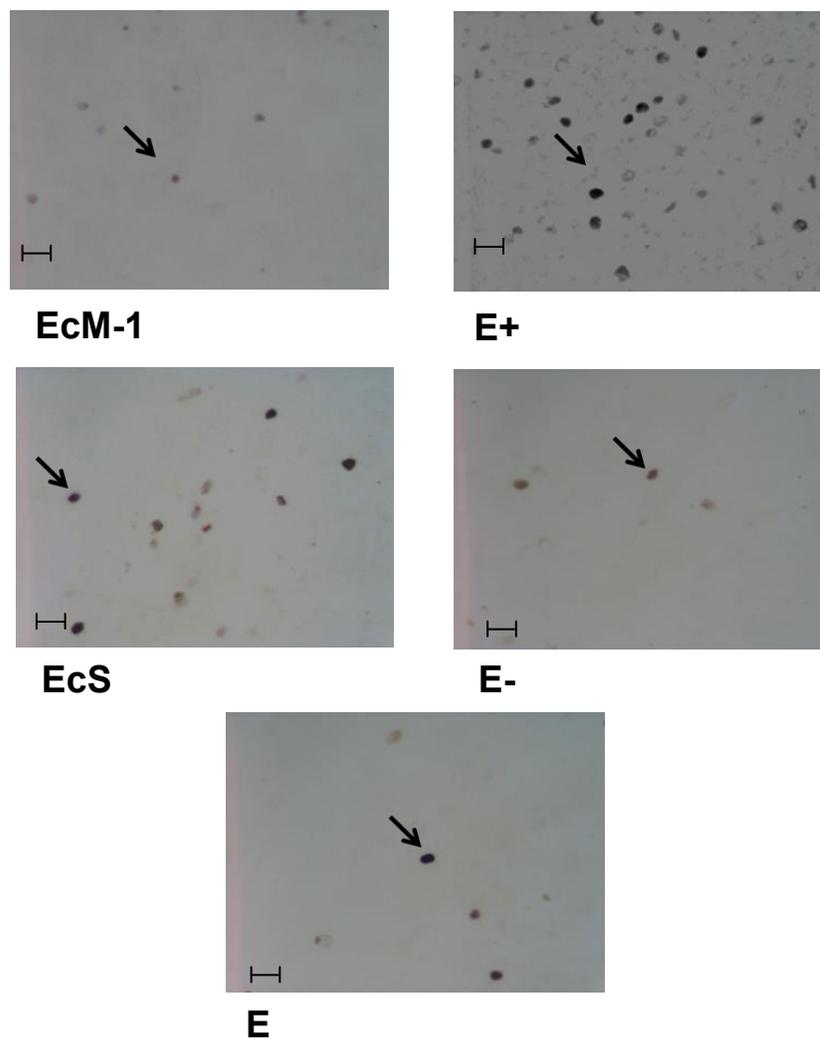
En la figura 10 se muestra el resultado de la cuantificación de la IR-Fos en el APM; en la subregión anterior se encontró una M= 15.33, media M= 16.77 y posterior M= 15.15 se siguió un patrón muy similar en las tres porciones estudiadas Así encontramos que los grupos EcM-1 y E+ muestran diferencias estadísticas frente al resto de los grupos y subregiones propuestas para el APM (ANOVA de un factor; anterior F= 18.304, media F= 14.842 y posterior F= 16.334 con una  $p < 0.05$ ).



**Figura 10. Cuantificación de neuronas con IR-Fos en el APM subregión anterior, media y posterior.** El grupo EcM-1 y el grupo E+ tienen una mayor marca frente a los demás grupos (EcS, E- y E). \*EcM-1 y E+ muestran diferencias significativas con los grupos EcS, E- y E en todas las subregiones del APM.

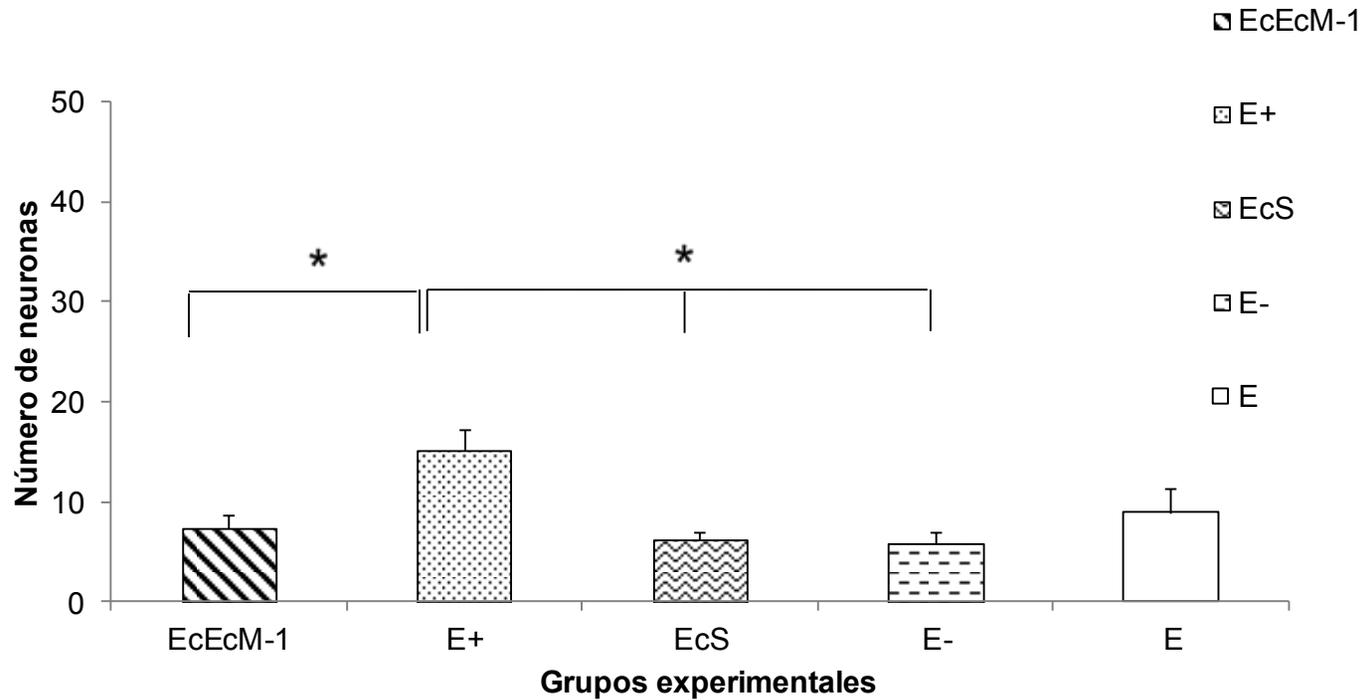
## IR-Fos de MePD

Se muestra el resultado de la cuantificación de la IR-Fos en el MePD; se encontró una  $M = 8.70$ , se siguió un patrón muy similar en las tres porciones estudiadas (prueba de Levene  $p = 0.87$ ). Así encontramos que los grupos EcM-1 y E+ muestran diferencias estadísticas frente al resto de los grupos y subregiones propuestas para el APM (ANOVA de un factor;  $F = 5.16$  con una  $p > 0.05$ ). Ver figura 12.



**Figura 11. Fotomicrografías representativas del MePD.** IR-Fos de los grupos (EcM-1, E+, EcS, E- y E). Las flechas señalan neuronas con IR-Fos. Escala de barra 20  $\mu\text{m}$ . 40X.

### IR-Fos en MePD

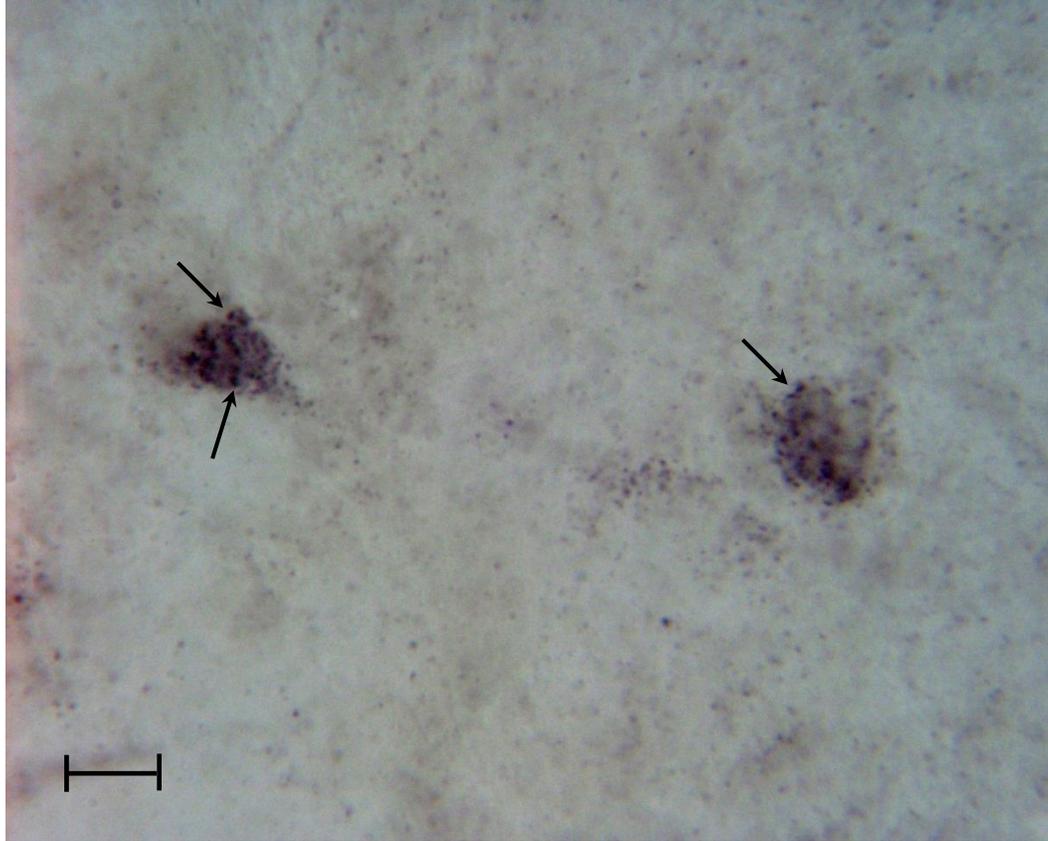


**Figura 12. Neuronas con IR.Fos en MePD.** El grupo E+ tiene una mayor marca frente a los demás grupos (EcM-1, EcS, E- y E). Análisis Anova de un factor por área con prueba de Tukey  $p < 0.05$ . \*E+ muestra diferencias significativas con los grupos EcM-1, EcS y E-.

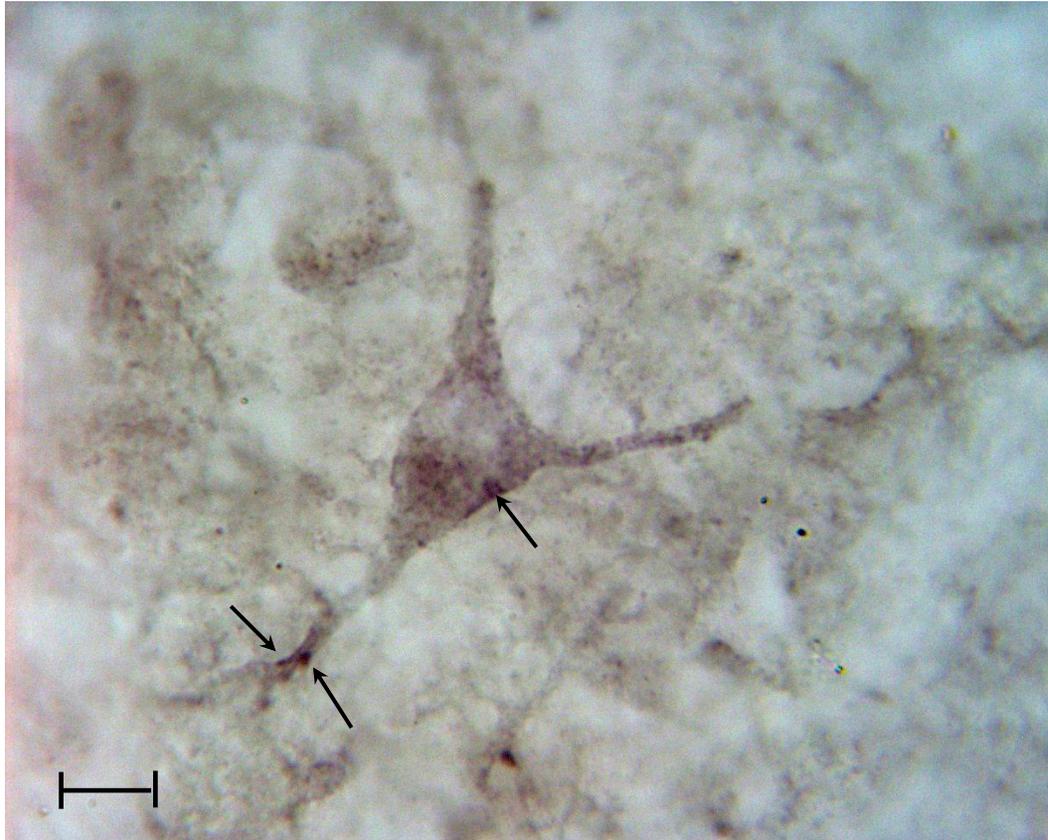
## **IR-MOR en APM.**

En las figuras 13 y 14 se muestran ejemplos de la cuantificación celular con internalización de endosomas (más de tres), mostrando la inmunorreactividad al receptor opide mu (IR-MOR), las neuronas con marca positiva a MOR en la superficie membranal o en las prolongaciones de las neuronas no fueron tomadas en cuenta para la cuantificación.

En la Cuadro 2 se concentra la cuantificación de la IR-MOR en neuronas en el APM de los diferentes grupos. De nuevo observamos que los grupos EcM-1 y EcS exhiben mayor número de internalización del MOR en las tres porciones propuestas para el APM, se encontró en la subregión anterior M= 11.40, media M= 12.98 y posterior M= 10.33. Así encontramos que los grupos EcM-1 y E+ muestran diferencias estadísticas frente al resto de los grupos y subregiones propuestas para el APM (ANOVA de un factor; anterior F= 9.44, media F= 14.07 y posterior F= 23.96 con una  $p < 0.05$ ). En las tres regiones existe mayor IR-MOR con diferencia significativa en los grupos EcM-1, EcS frente al resto.



**Figura 13. Internalización del MOR en el APM.** Los receptores internalizados en la neurona se señalan con las flechas. Escala de barra 10  $\mu\text{m}$ . 100X.



**Figura 14. Neurona del APM con IR-MOR no internalizados.** Los MOR se encuentran en las prolongaciones y en la superficie membranal de la neurona sin una internalización. Las flechas señalan la marca del receptor mostrada por inmunorreactividad. Escala de barra 10  $\mu$ m. 100X.

### Internalización del MOR en APM.

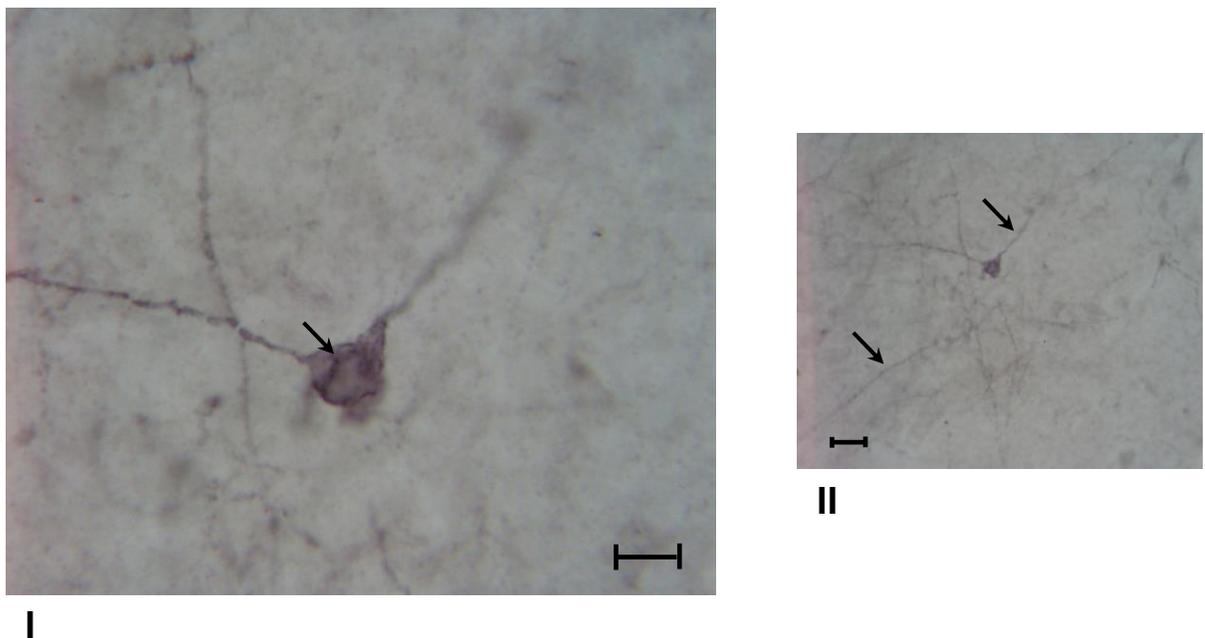
| Subregión        | Grupos<br>(n=8) | M     | F     | Error<br>típico |
|------------------|-----------------|-------|-------|-----------------|
| <b>Anterior</b>  | EcM-1*          | 27.25 | 9.94  | ±6.49           |
|                  | E+ <sup>§</sup> | 20.38 |       | ±4.63           |
|                  | EcS             | 2.38  |       | ±0.77           |
|                  | E-              | 2.38  |       | ±1.25           |
|                  | E               | 4.63  |       | ±1.48           |
| <b>Media</b>     | EcM-1*          | 32.50 | 14.07 | ±5.41           |
|                  | E+ <sup>§</sup> | 19.13 |       | ±4.20           |
|                  | EcS             | 3.50  |       | ±0.75           |
|                  | E-              | 2.38  |       | ±1.38           |
|                  | E               | 7.38  |       | ±2.90           |
| <b>Posterior</b> | EcM-1*          | 32.63 | 23.96 | ±4.78           |
|                  | E+ <sup>§</sup> | 15.00 |       | ±3.16           |
|                  | EcS             | 2.0   |       | ±0.84           |
|                  | E-              | 0.75  |       | ±0.36           |
|                  | E               | 4.25  |       | ±1.89           |

**Cuadro 2.** Resultado de la prueba de IR-MOR en APM. Análisis Anova de un factor por área con prueba de Tukey  $p < 0.05$ . E+<sup>§</sup> y EcM-1\* para las tres áreas muestran diferencias significativas con EcS, E- y E.

## IR-MOR en MePD.

En la figura 15 se muestran ejemplos de las neuronas con IR-MOR en la superficie celular correspondientes al MePD y en el Cuadro 3 se concentra la cuantificación de la IR-MOR.

El grupo EcM-1 muestra similitud con el grupo E+, mostrando una alta internalización del MOR significativa frente al resto de los grupos. El grupo E+ muestra una similitud con los grupos EcM-1 y E, que resulta significativa frente al resto de los grupos con un valor de  $M= 7.10$   $F= 20.83$ ,  $p>0.05$ .



**Figura 15. Fotomicrografías de neuronas en el MePD que ejemplifican la IR-MOR.** I. Los receptores se encuentran internalizados en la neurona. La flecha señala la marca del MOR. Escala de barra 10  $\mu$ m.100x II. Fibras neuronales marcadas como resultado de la IR-MOR. La flecha señala una fibra neuronal. Escala de barra 20  $\mu$ m. 40X.

### Internalización del MOR en MePD.

| Áreas | Grupos<br>( <i>n</i> =8) | <i>M</i> | <i>F</i> | Error<br>típico |
|-------|--------------------------|----------|----------|-----------------|
| MePD  | EcM-1*                   | 12,88    | 20,83    | ±1.29           |
|       | E+ <sup>§</sup>          | 10,88    |          | ±1.27           |
|       | EcS                      | 1,50     |          | ±0.75           |
|       | E-                       | 2,63     |          | ±0.82           |
|       | E <sup>□</sup>           | 7,63     |          | ±0.981          |

**Cuadro 3.** Resultado de la prueba de IR-MOR en MePD. Análisis Anova de un factor con prueba de Tukey  $p < 0.05$ . EcM-1\* muestra diferencias significativas frente a EcS, E- y E. E+<sup>§</sup> muestra diferencia estadística frente a EcS y E-. E<sup>□</sup> tiene diferencias significativas con EcM-1, EcS y E-.

## DISCUSIÓN

Una de las herramientas más utilizadas en diversos estudios para la demostración de la actividad neuronal es la IR-Fos, este tipo de estudios proporcionan un método complementario para mapear circuitos cerebrales que se activan tras la ejecución de una conducta, como lo es en este caso la conducta sexual masculina (Hull *et al.*, 2006; Balfour *et al.*, 2004; Bialy y Kaczmareck, 1996), en este estudio se observa la cuantificación de neuronas activas en APM y en MePD tras presentar conducta sexual o después de administrar el péptido opioide EM-1.

La evidencia histológica de este estudio muestra que la actividad neural tras la conducta sexual provoca una activación muy similar a la administración EM-1, lo que nos permite asociar la activación del sistema opioide particularmente del MOR, tanto por la actividad sexual como por la presencia de EM-1.

Baum y Everitt en 1992 muestran la IR-Fos como una actividad neuronal elevada en APM, en estría terminal y Me como resultado de la eyaculación en la rata macho. Dhungel y colaboradores en el 2011 reportan como resultado de una actividad precopulatoria y copulatoria una alta IR-Fos en APM y AMe, esto nos muestra que el APM y MePD tienen un papel importante dentro de la modulación de la conducta sexual.

Domínguez y Hull en el 2005 mencionan que la eyaculación provoca una alta IR-Fos en el núcleo preóptico posterodorsal en ratas, hamsters y jerbos machos, sugieren por lo tanto que podría existir una subregionalización del APM que puede

desarrollar diferentes papeles en la regulación de la conducta sexual. Esta regionalización tendría una necesaria relación funcional de aferencias al APM. Se han descrito tres subdivisiones citoarquitectónicas de entradas al APM (lateral, central y medial), el APM recibe aferencias principales de las regiones límbicas, incluyendo amígdala, subículo ventral y núcleo septal ventral lateral, las cuales terminan en la parte lateral del APM; la proyección del NCET parece finalizar preferentemente en la parte central del APM y la subdivisión medial puede recibir entradas relativamente escasas de las áreas corticales infralímbicas e insulares, del núcleo accumbens y la sustancia innominada, las proyecciones serotoninérgicas del núcleo del rafe parecen terminar en la parte lateral del APM, mientras que las neuronas noradrenérgicas se distribuyen en la parte central y medial del núcleo (Simerly y Swanson, 1986). Balthazart y Ball en 2007 estudiaron subregiones del APM (media, central y laterales) suponiendo que están implicadas en la activación del estado apetitivo o motivacional y consumatorio dentro de la conducta sexual; sin embargo, no se encuentra una determinación de la actividad específica de la citoestructura por subregiones que se pueda delimitar a través de IR-Fos.

En el presente estudio nos propusimos demostrar una posible regionalización en el APM correlacionada con la ejecución de la conducta copulatoria y con la estimulación farmacológica de EM-1, no encontramos diferencias significativas entre el área anterior, media y posterior en la activación neural por la IR-Fos, por lo que sugerimos que el APM participa en la ejecución de la conducta sexual sin poder decir que existe una subregionalización específica en la rata macho de la cepa *wistar*. No obstante se recomienda abordar dicha

regionalización con otros recursos experimentales que permitan abundar más sobre este tema, como lo es la inmunofluorescencia o radioinmunoensayos.

Estudios anteriores vinculan la IR-Fos en hipotálamo con la presencia de feromonas por parte de hembras receptoras (Pfaus *et al.*, 2001). Las señales feromonales se detectan principalmente por las neuronas receptoras en el OVN, que envían sus proyecciones al BOA donde se comunican con la Me, las neuronas de la MePD a su vez se comunican con el NCET y con APM. El apareamiento induce una IR-Fos en varias zonas del encéfalo a los 30 min., entre ellas la AMe y el APM. (Agmo y Pfaff, 1999.; Paredes 2003; Coolen *et al.*, 1996).

En este trabajo se muestra que en la MePD, el grupo expuesto a hembras receptoras en la arena de cópula tiene una mayor actividad neuronal significativa frente a los demás grupos. Veening y colaboradores en el 2005 indican que la Me y estructuras hipotalámicas parecen desempeñar un papel importante dentro de la conducta sexual. Se ha demostrado que la activación de c-Fos en la MePD es resultado de las señales odoríferas que se vinculan con la fase precopulatoria y a su vez esta comunican al APM para dar como resultado la conducta sexual (Dhungel *et al.*, 2011; Pfaus *et al.*, 2001; Baum y Everitt, 1992). La activación de c-Fos en la MePD ha sido atribuida al apareamiento y receptores quimiosensoriales ya que está vinculado con el sistema vomeronasal (Fernández y Meredith, 1998; Simerly y Swanson, 1988), se ha informado que la activación de la Me se puede observar en su gran mayoría por la entrada de estímulos quimiosensorial provenientes de las células mitrales del órgano olfatorio (Hull *et al.*, 2006). Por lo que en este trabajo se confirma que la MePD es importante para

la comunicación del circuito neuronal implicado en la conducta sexual en la rata macho.

Varias líneas de investigación indican que la recompensa sexual está mediada por opioides, la baja administración de opioides como la morfina provoca una alta activación de receptores opioides; sin embargo, una dosis elevada provoca una inhibición incluso de la conducta sexual en machos incluyendo especies tan diversas como peces, anfibios (anuros), reptiles (lacertilios y ofidios), aves (pollo, codorniz) y diversos mamíferos (ratón, hámster, rata, cobayo, hurón, cabra, gato, perro y el mono Rhesus) (Paredes, 2014; Pfaus *et al.*, 2012; Paredes, 2003; Sinchak y Micevych, 2003; Matuszewich y Dornan, 1992; Agmo y Paredes 1988).

Se han examinado los efectos del sistema opioide con el fin de evaluar su activación a través de su internalización, endogenamente modulan diferentes sistemas de neurotransmisión como la dopamina, noradrenalina y serotonina, los cuáles también se involucran en la regulación de la conducta sexual (Bodnar, 2012; Arttamangkul *et al.*, 2006; Coolen *et al.*, 2004; Pfaus y Gorzalka, 1987). Se ha especulado sobre la posible participación de diferentes receptores opioides en la regulación conductual con efectos diferentes, basados en inyecciones icv, en donde la activación con alta afinidad por el receptor  $\mu_1$  inhibe la conducta sexual a diferencia de los receptores de baja afinidad como lo son los  $\mu_2$ , facilitando la conducta sexual (Matuszewich y Dornan, 1992; Pfaus y Gorzalka, 1987). Por lo que en diversas investigaciones se ha reconocido que los agonistas a los opioides tienen un papel inhibitorio en el comportamiento sexual masculino (Paredes, 2014;

Pfaus *et. al.*, 2012; Arttamangkul *et. al.*, 2006; Sinchak y Micevych, 2001; Zandina *et.al.*, 1987). Por otra parte Band y Hull en 1990 reportan que inyecciones unilaterales en dosis bajas de morfina y dinorfina en APM causan una facilitación de la conducta sexual en la rata macho, dosis elevada de 6 nmol causan inhibición en el comportamiento copulatorio.

En este estudio se muestra la marca inmunohistoquímica del MOR después de un evento natural, como lo es el comportamiento a la conducta sexual en la rata macho así como la administración de un opioide de alta especificidad al MOR como lo es la EM-1. Esto nos permite proponer que la EM-1 tiene una participación en el sustrato neuronal implicado en la conducta sexual masculina demostrado a través de la IR-MOR.

Simerly y Swanson en 1988 sugiere que son varios los opioides que participan dentro de la conducta sexual incluyendo endorfinas, encefalinas y endomorfina. El comportamiento sexual es un estímulo fisiológico que libera opioides endógenos con dos posibles efectos: para facilitar la presentación del comportamiento sexual y para mejorar las propiedades gratificantes de apareamiento y la eyaculación (Parra *et al.*, 2009; Parra-Gómez, 2011; Paredes y Agmo, 1992;). En este estudio los resultados muestran que la internalización del MOR en la subregión anterior, media y posterior en APM es similar en el grupo expuesto a hembras receptivas y el grupo con administración de EM-1, se puede proponer que la endocitosis del MOR en el APM es inducida por un comportamiento natural como lo es la conducta sexual, por lo que, al endocitarse

el MOR por administración icv de la EM-1 puede sugerirse que forma parte del sistema endógeno y modulación en la conducta sexual de la rata macho.

Existe evidencia de la importante participación de la amígdala en la precepción de señales olfativas sexualmente relevantes, la MePD en roedores integra la información olfativa y feromonal, que junto con las señales hormonales adecuadas, puede facilitar el comportamiento reproductivo en la edad adulta. (Pardo *et al.*, 2012; Dhungel, *et. al.*, 2011; Morris *et al.* 2008; Lehman y Winans, 1982).

En esta investigación la MePD muestra que el grupo expuesto a hembras receptivas presenta un incremento significativo de endocitosis del MOR, y aún mayor para el grupo con administración de EM-1 icv. Esta diferencia en la activación posiblemente se relacione a que la estimulación farmacológica, lo que representa una saturación de receptores con posibilidad de activación tras la cópula extenuante como la saciedad sexual.

En relación al grupo E en la MePD existe una internalización que indica variabilidad de respuesta, sugerimos que debido al espacio donde se realizaba la prueba conductual, que se compartió con otros experimentos similares, provocó que los machos que estaban solos en la arena de cópula percibieran a las hembras receptivas de los otros experimentos, así este estímulo olfativo originó internalización del MOR en el MePD. La evaluación en MePD nos propone que tanto esta región amigdalina como el APM constituyen sitios de activación opioide

originada por la actividad sexual, así como la importancia que tiene el sistema opioide en este proceso conductual y en particular el MOR.

Parra y colaboradores en el 2013 proponen que la activación de MOR por administración de EM-1, es un importante modulador dentro del APM para la ejecución de la conducta sexual. En este estudio se observó que la EM-1 efectivamente modifica la activación neuronal provocando internalización del MOR así como su correlación tras la ejecución de la cópula. Así, este trabajo muestra la bioactividad de este péptido en el sistema opioide vinculado con la conducta sexual masculina. Esto propone a este péptido como parte del sistema opioide endógeno en el circuito neural de la conducta sexual de la rata macho.

## **CONCLUSIÓN.**

La ejecución de la conducta sexual y la administración icv de EM-1 indujo activación neuronal semejante, evaluadas a través de la IR con la proteína c-Fos.

En la región de MePD se observó que solo la actividad copulatoria indujo IR-cFos significativa. El resto de las condiciones indican activación neuronal basal.

El MOR fue internalizado en APM tras la ejecución de la conducta sexual así como por la estimulación farmacológica tras la administración EM-1.

El área posterior del APM es la única región que mostró una mayor internalización del MOR originada por la actividad copulatoria.

La MePD presentó una mayor internalización de MOR por la exposición a una hembra receptiva, por la EM-1 y los animales solos en la arena de cópula.

La EM-1 es un péptido opioide que indujo activación opioide semejante a lo observado por la ejecución de la conducta sexual.

**Anexo 1.**

**Receptores opioides**

| Precursor                  | Mu ( $\mu$ )                                     | Delta ( $\delta$ )                                       | Kappa ( $\kappa$ )                               | ORL1  |
|----------------------------|--|--|--|---|
| Ligandos endógenos         | $\beta$ -endorfina<br>Metorfamida<br>Endomorfina | Metionina<br>Encefalina<br>Leucina<br>$\beta$ -endorfina | Dinorfina A1-13<br>Dinorfina A1-8<br>Dinorfina B | Nociceptina/Orfina FQ   |
| <b>Ligandos sintéticos</b> | Morfina<br>DAMGO                                 | DPDPE<br>SNC-80<br>DSTBULET                              | U50488H<br>Bremazocina<br>Pentazocina            | -----   |
| <b>antagonistas</b>        | Naloxona<br>$\beta$ -FNA                         | Naltrindole<br>Naloxona                                  | Naloxona<br>Nor-BNI                              | [Phe <sup>1</sup> $\psi$ (CH <sup>2</sup> -NH)-Gly <sup>2</sup> ] NC<br>(1-13)NH <sup>2</sup> |

**Cuadro 4.** Receptores opioides con sus ligandos endógenos, sintéticos y sus antagonistas, modificada de Fichna et al. 2007.

## REFERENCIAS

- Agmo, A., G. R. Paredes. 1988. Opioids and sexual behavior in the male rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 30(4), 1021-1034.
- Agmo, A., Pfaff, D.W., 1999, Research on the neurobiology of sexual behavior at the turn of the millennium. *Behavioural Brain Research*, 105, 1–4.
- Akil, H., C. Owens, H. Gutstein, L. Taylor, C. Eileen., S. Watson. 1998. Endogenous opioid: over and current issues. *Drug and Alcohol Dependence* 51, 127-140.
- Argiolas, A. 1999. Neuropeptides and sexual behavior. *Neuroscience and Behavioral Reviews* 23, 1127-1142.
- Arttamangkul, S., M. Torrecilla, K. Kobayashi, H. Okano., J. T. Williams. 2006. Separation of  $\mu$ -opioid receptor desensitization and internalization: endogenous receptors in primary neuronal cultures. *The Journal of Neuroscience* 26(15), 4118-4125.
- Ashwell, K. W., G..Paxinos. (2008). *Atlas of the developing rat nervous system*. Academic Press.
- Balfour, M. E., L. Yu, L. M. Coolen. 2004. Sexual behavior and sex-associated environmental cues activate the mesolimbic system in male rats. *Neuropsychopharmacology* 29, 718–730.
- Balthazart, J., G. F. Ball. 2007. Topography in the preoptic region: differential regulation of appetitive and consummatory male sexual behaviors. *Frontiers in Neuroendocrinology* 28(4), 161-178.
- Band, L. C., E. M Hull. 1990. Morphine and dynorphin (1–13) microinjected into the medial preoptic area and nucleus accumbens: effects on sexual behavior in male rats. *Brain Research* 524(1), 77-84.

- Baum, M. J., B. J. Everitt. 1992. Increased expression of c-fos in the medial preoptic area after mating in male rats: role of afferent inputs from the medial amygdala and midbrain central tegmental field. *Neuroscience* 50(3), 627-646.
- Bialy, M., L. Kaczmarek. 1996. c-Fos expression as a tool to search for the neurobiological base of the sexual behavior of males, *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 56, 567-577.
- Bodnar, R. J. 2012. Endogenous opiates and behavior: 2011. *Peptides* 38, 463–522.
- Boehm, U. 2006. The vomeronasal system in mice: From the nose to the hypothalamus-and back. En: *Seminars in cell and developmental biology* (pp. 471-479). Vol. 17, No. 4, Amsterdam: Academic Press.
- Cibrian, L. T., S. M. Tecamachaltzi, D. R. Triana, J. G. Pfaus y A.G.A Coria. 2010. Clitoral stimulation modulates appetitive sexual behavior and facilitates reproduction in rats. *Physiology and Behavior* 100, 148–153.
- Contreras, J. L., A. Agmo. 1993. Sensory control of the male rat's copulatory thrusting patterns. *Behavioral and Neural Biology* 60, 234–240.
- Coolen, L. M., M. E. Fitzgerald, L. Yu., M. N. Lehman. 2004. Activation of mu opioid receptors in the medial preoptic area following copulation in male rats. *Neuroscience* 124, 11-21.
- Coolen, M.L., H. P. W. Peters., J. G. Veening. 1996. Fos immunoreactivity in the rat brain following consummatory elements of sexual behavior: a sex comparison. *Brain Research* 738, 67-82.
- Dohlman, H. G., J. Thorner, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz. 1991. Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annual Review of Biochemistry* 60(1), 653-688.

- Domínguez, J. M., E. M. Hull. 2005. Dopamine, the medial preoptic area, and male sexual behavior. *Physiology and Behavior* 86, 356–368
- Dhungel, S., M. Masaoka, D. Rai, Y. Kondo., Y. Sakuma. 2011. Both olfactory epithelial and vomeronasal inputs are essential for activation of the medial amygdala and preoptic neurons of male rats. *Neuroscience* 199, 225-234.
- Fichna, J., A. Janecka, J. Costentin., J. C. Do Rego. 2007. The endomorphin system and its evolving neurophysiological role. *Pharmacological Reviews* 59, 88-123.
- Giuliano, C., T. W. Robbins, P. J. Pradeep, E. T. Bullmore., B. Everitt. 2012. Inhibition of opioid transmission at the  $\mu$ -opioid receptor prevents both food seeking and binge-like eating. *Neuropsychopharmacology* 37, 2643–2652.
- Guevara, P. M. A., G. C. Amezcua, G. M. Hernández., M. A. Sanz. 2012. SexyMater: programa computacional para el registro y análisis de conductas sexuales y maternas en roedores. *Neurobiología* 1-13.
- Goldberg, J. 1999. Las endorfinas: anatomía de un descubrimiento científico que puede llevar al premio nobel. Gedisa. 200 pp.
- Holloway, K. S. 2012. Opioid mediation of learned sexual behavior. *Socioaffective Neuroscience and Psychology* 2, 1–9.
- Hull, E. M., M. G. Rodríguez. 2009. Male sexual behavior. En Pfaff, D. W., A. P. Arnold, A. M. Etgen, S. E. Fahrbach y R. T. Rubin, (Eds.). *Hormones, brain and behavior* (pp. 5-65), 2da edición, Vol.1. San Diego: Academic Press.
- Hull, E. M., I. R. Wood., E. K. McKenna. 2006. Neurobiology of male sexual behavior. En: Neill, J. D., (Ed.), *Knobil and Neill's Physiology of reproduction* (pp. 1729-1824). Tercera edición, Vol. 2, San Diego: Academic Press.

- Keith, D. E., S. R. Murray, P. A. Zaki, P. C. Chu, D. V. Lissin, L. Kang, C. L. Evans., M. V. Zatrow. 1996. Receptor without causing their rapid internalization. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 32, 19021-19024.
- Larsson, K., S. Ahlenius. 1999. Brain and sexual behavior. *Annals of the New York Academy of Sciences* 877, 292–308.
- Lehman, N. M., S. S. Winans. 1982. Vomeronasal and olfactory pathways to the amygdala controlling male hamster sexual behavior: Autoradiographic and Behavioral Analyses. *Brain Research* 240, 27–41.
- Lucio, R., J. L. Tlachi, A. A. López, R. Zempoalteca., V. J. Moctezuma. 2009. Análisis de los parámetros del eyaculado en la rata wistar de laboratorio: descripción de la técnica. *Veterinaria México*, 405–416.
- Lucio, R., J. L. Tlachi. 2008. Análisis de la cópula y el eyaculado en la Rata Albina (*RattusNorvegicus*). *Manual de laboratorio*. Primera edición, Gongora ediciones, Tlaxcala, México. (pp. 48)
- Matuszewich, L., W. A. Dornan. 1992. Bilateral injections of a selective  $\mu$ -receptor agonist (morphiceptin) into the medial preoptic nucleus produces a marked delay in the initiation of sexual behavior in the male rat. *Psychopharmacology* 106(3), 391-396.
- Moallem, S .A., M. K. Balali., M. M. Balali. 2011. Opioids and opiates. En: Mozayani, A. y L. Raymon, (Eds.). *Handbook of drug interactions: a clinical and forensic guide* (pp. 123-148), Second Edition, Totowa, New Jersey: Humana Press.
- Morris, J. A., C. L. Jordan., S. M. Breedlove. (2008). Sexual dimorphism in neuronal number of the posterodorsal medial amygdala is independent of circulating androgens and regional volume in adult rats. *Journal of Comparative Neurology* 506(5), 851-859.

- Paredes, G. R., A. Agmo, 1992. Facilitation of Sexual Behavior Shortly After Electrolytic Lesion of the Medial Preoptic Area : What Does It Mean?. *Brain Research Bulletin* 29, 125-128.
- Paredes, G. R., L. Highland., P. Karam. 1993. Socio-sexual behavior in male rats after lesions of the medial preoptic area: evidence for reduced sexual motivation. *Brain Research* 618, 271–276.
- Paredes, G. R., 2003. Medial preoptic area/anterior hypothalamus and sexual motivation. *Scandinavian Journal of Psychology* 44, 203–12.
- Paredes, G. R. 2014. Opioids and sexual reward. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 121, 124-131.
- Pardo B. C., B. C. Moretti, A. Novejarque, F. G. Martínez, E. Lanuza. 2012. Differential efferent projections of the anterior, posteroventral, and posterodorsal subdivisions of the medial amygdala in mice. *Frontiers in Neuroanatomy*, 6.
- Parra-Gómez, L. 2011. Participación de la Endomorfina-1 en la conducta sexual de la rata macho. Tesis de Doctorado en Ciencias. Juriquilla, Querétaro. 93 pp.
- Parra, G. L., H. A. García, J. A. Salazar, B. Antón., G. R. Paredes. 2009. Endomorphin-1, effects on male sexual behavior. *Physiology and Behavior* 97, 98–101.
- Parra, G. L., H. A. García., R. G. Paredes. 2013. Infusion of endomorphin-1 (EM-1) in the MPOA and the Me modulate sexual and socio-sexual behavior in the male rat. *Brain Research* 1, 1–8.
- Pfaus, G. J., B. B. Gorzalka. 1987. Selective activation of opioid receptors differentially affects lordosis behavior in female rats. *Peptides* 8, 309–17.

- Pfaus, J. G. 1999. Neurobiology of sexual behavior. *Current Opinion in Neurobiology* 9, 751–758.
- Pfaus, G. E., E. T. Kippin, S. Centeno. 2001. Conditioning and sexual behavior: a review. *Hormones and Behavior* 40, 291–321.
- Pfaus, J. G., M. F. Wilkins, N. DiPrieto, M. Benibgui, R. Toledano, A. Rowe y C.M. Castro. 2010. Inhibitory and disinhibitory effects of psychomotor stimulants and depressants on the sexual behavior of male and female rats. *Hormones and Behavior* 58, 163-176.
- Pfaus, J. G., T. E. Kippin, G. A. Coria-Avila, H. Gelez, V. M. Afonso, N. Ismail, M. Parada. 2012. Who, what, where, when (and maybe even why)? How the experience of sexual reward connects sexual desire, preference, and performance. *Archives of Sexual Behavior* 41(1), 31-62.
- Robertson, G. S., J. G. Pfaus, L. J. Atkinson, H. Matsumura, A. G. Phillips, H. C. Fibiger. 1991. Sexual behavior increases c-fos expression in the forebrain of the male rat. *Brain Research* 564, 352-357.
- Rodriguez, M, G., G, A. Fernández. 1995. Opioid antagonists and the sexual satiation phenomenon. *Psychopharmacology* 122,131-136.
- Rodríguez, M, G., F. Pellicer. 2010. Electrical stimulation of dorsal and ventral striatum differentially alters the copulatory behavior of male rats. *Behavioral Neuroscience* 124, 686–694.
- Romero, C. J. C., E. A. Hurtazo., R. G. Paredes. 2007. Central tegmental field and sexual behavior in the male rat: effects of neurotoxic lesions. *Neuroscience* 148, 867-875.
- Segovia, S., A. Guillamón. 1993. Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway and sex differences in reproductive behaviors. *Brain Research Reviews* 18, 51-74.

- Simerly, R. B., L. W. Swanson. 1986. The organization of neural inputs to the medial preoptic nucleus of the rat. *Journal of Comparative Neurology* 246(3), 312-342.
- Simerly, R. B., L. W. Swanson. 1988. Projections of the medial preoptic nucleus: A *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin anterograde tract-tracing study in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 270, 209-242.
- Sinchak, K., E. P. Micevych. 2001. Progesterone blockade of estrogen activation of  $\mu$ -opioid receptors regulates reproductive behavior. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 21, 5723–5729.
- Sinchak, K., E. P. Micevych. 2003. Visualizing activation of opioid circuits by internalization of G protein-coupled receptors. *Molecular Neurobiology* 27(2), 197-222.
- Swaney, W. T., N. B. Dubose, P. J. Curley, S. F. Champagne. 2012. Sexual experience affects reproductive behavior and preoptic androgen receptors in male mice. *Hormones and Behavior* 61, 472–478.
- Van, Fourth. W. R., W. Gerrit, J. M. Van. 1995. Regulation of masculine sexual behavior: involvement of brain opioids and dopamine. *Brain Research Reviews* 21,162-184.
- Veening, J.G., L. M. Coolen, R. J. Trynke, W. J. Henk, F. B. Sietze, J. M. Koolhaas., O. Berend. 2005. Do similar neural systems subserve aggressive and sexual behavior in male rat? Insights from c-Fos and pharmacological studies. *European Journal of Pharmacology* 526, 226-339.
- Wang, Q. P., J. E. Zadina, J. L. Guan., S. Shioda. 2002. Recent Advances in the Search for the  $\mu$ -Opioidergic System Morphological Studies of the Endomorphinergic Neurons in the Central Nervous System. *Journal Pharmacology* 89, 209-215.

Waldhoer, M., S. E. Bartlett, J. L. Whistler, 2004. Opioid receptors. *Annual Review of Biochemistry* 73, 953–990.

Zadina, J. E., L. Hackler, L. J. Ge., A. J. Kastin. 1997. A potent and selective endogenous agonist for the  $\mu$ -opiate receptor. *Nature* 386, 499-502.