



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

DIFERENCIAS EN INERVACIÓN PERIFÉRICA DEL EPIDÍDIMO Y
GLANDE ENTRE RATAS MACHO COPULADORAS Y NO
COPULADORAS: UN ESTUDIO DE INMUNOHISTOQUÍMICA

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN PSICOLOGÍA
PRESENTA

RODRIGO ALBERTO ISLAS PÉREZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. GABRIEL GUTIÉRREZ-OSPINA
REVISORA DE TESIS: DRA. IRMA YOLANDA DEL RIO ORTEGA



MÉXICO, CIUDAD UNIVERSITARIA,

ABRIL, 2016.

CDMX



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.

Reconocimientos y Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología de Sistemas del Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Muchas Gracias.



ÍNDICE	PÁGINA
RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
1. ANTECEDENTES.....	6
1.1 <i>Competencia espermática: Generalidades</i>	6
1.2 <i>Adaptaciones conductuales relacionadas con la competencia espermática</i>	10
2. MODELOS TEÓRICOS DE COMPETENCIA ESPERMÁTICA.....	11
2.1 <i>Cambios conductuales no contemplados por los modelos de competencia espermática</i>	14
3. FENOTIPOS COPULATORIOS EN LA RATA MACHO.....	15
3.1 <i>Teoría trófica: inervación-representación</i>	18
4. EPIDÍDIMO Y GLANDE COMO EFECTORES EN LA FISIOLÓGÍA DE LA EYACULACIÓN.....	19
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
5.1 <i>Justificación</i>	22
5.2 <i>Objetivo general</i>	22
5.3 <i>Objetivos específicos</i>	22
5.4 <i>Hipótesis</i>	22
5.5 <i>Variables</i>	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS	
6.1 <i>Animales</i>	23
6.2 <i>Obtención, medición y procesamiento de las muestras</i>	24
6.3 <i>Inmunohistoquímica contra fibras catecolaminérgicas y colinérgicas</i>	24
6.4 <i>Conteo de fibras nerviosas</i>	26
6.5 <i>Análisis estadístico</i>	27
6.6 <i>Diseño Experimental</i>	28
7. RESULTADOS.....	29

8. DISCUSIÓN.....	32
9. CONCLUSION.....	35
10. REFERENCIAS.....	36
11. ANEXO.....	42

Resumen

La competencia espermática fue descrita por Parker en los 70's trabajando con insectos, y desde entonces ha sido observada a lo largo de la escala taxonómica considerándola como la fuerza selectiva más importante en la biología reproductiva. Esta competencia ejerce una enorme presión evolutiva sobre los machos, los cuales han generado diversas adaptaciones fisiológicas, morfológicas y conductuales para asegurar la transferencia de sus genes a las próximas generaciones. Investigaciones posteriores documentaron que cuando los machos se encontraban en ambientes competitivos podían ajustar la cantidad y la calidad del contenido eyaculatorio. Posteriormente surgieron modelos matemáticos que trataron de pronosticar la calidad y cantidad del esperma inseminado en el tracto reproductor de la hembra cuando el encuentro copulatorio tenía lugar bajo distintos contextos competitivos. Sin embargo, los modelos de Parker no contemplan la variabilidad fenotípica ni las diferencias en la expresión de conducta copulatoria que son inherentes a una población de machos, por lo que las predicciones del modelo pudiesen ser equívocas en muchos casos. Con la finalidad de comprender la expresión de la diversidad de la conducta masculina en contextos competitivos es necesario conocer la fisiología subyacente a los distintos fenotipos copulatorios masculinos.

Experimentos realizados en nuestro laboratorio documentaron que los machos copuladores poseen representaciones corticales de los genitales que son de menor tamaño en comparación de aquellas observadas en ratas macho no copuladoras. Es por ello que en el presente trabajo evaluamos si el glande, principal entrada sensorial de los genitales, y el epidídimo, el órgano efector de la eyaculación, están distintamente inervados en ratas macho copuladoras y no copuladoras. Nuestros resultados muestran que existen diferencias en el porcentaje de área ocupada por la inervación autonómica colinérgica en el glande e inervación catecolaminérgica en el epidídimo entre las ratas macho copuladoras y no copuladoras. Estos hallazgos sugieren que diferencias en la expresión de la conducta copulatoria entre machos no sólo se asocian con diferencias fisiológicas y anatómicas de algunas estructuras cerebrales sino también del porcentaje del área inervada por fibras autonómicas periféricas en el glande y epidídimo.

Palabras clave: biología de la reproducción, competencia espermática, modelos de competencia espermática, fenotipos copulatorios, inervación periférica, inmunohistoquímica.

Introducción

La competencia espermática es el proceso de selección por medio del cual los espermatozoides vivos de dos o más machos coinciden en el tracto reproductor de una hembra y, como consecuencia, se establece una competencia entre los gametos masculinos por fertilizar aquellos femeninos (Parker, 1970). Esta competencia ha resultado en una presión evolutiva tal, que los machos han sido forzados a desarrollar diversas adaptaciones fisiológicas, morfológicas y conductuales que les permitan mejorar sus posibilidades asegurar la paternidad de sus crías. Consecuentemente surgieron modelos matemáticos “económicos” que tratan de predecir las cualidades y calidad del semen cuando los encuentros copulatorios tienen lugar bajo distintos contextos de competencia sexual. En este escenario, los modelos de competencia espermática estiman que cuando un macho es capaz de percibir señales de promiscuidad femenina o presumir la presencia de machos competidores, ajustará la cantidad de espermatozoides inseminados en función del riesgo o la intensidad de dicha competencia (Parker, 1997). Sin embargo, existen limitaciones predictivas en los modelos de competencia espermática ya que no contemplan la diversidad fenotípica, esto es, las distintas expresiones de conducta sexual que muestran los machos en distintas especies y por consecuencia consideran que todos los machos se comportarán de la misma forma al actuar bajo determinado contexto competitivo.

Diversos estudios han identificado distintos fenotipos copulatorios en ratas macho. Éstos han sido clasificados en función de parámetros copulatorios como número de montas, número de intromisiones y latencias eyaculatorias. En términos generales, se considera que, al menos en las ratas, existen dos fenotipos principales: los machos copuladores y los no copuladores. Los machos copuladores pueden ser sub-clasificados como de latencia eyaculatoria larga, normal o corta (Pattij et al., 2005; Portillo et al., 2006; 2007). Teniendo esto en mente, y con el propósito de mejorar el alcance predictivo de los modelos de competencia espermática propuestos, consideramos necesario entender los mecanismos que subyacen a estos fenotipos copulatorios. Se ha propuesto que cambios en los niveles de la enzima aromatasa, estrógenos y andrógenos a nivel

del sistema nervioso central son causa de las diferencias fenotípicas entre ratas macho copuladoras y no copuladoras (Portillo et al., 2006, 2007). Por otra parte experimentos en curso realizados en nuestro laboratorio han documentado que los machos copuladores poseen representaciones corticales de los genitales que son de menor tamaño en comparación de aquellas observadas en ratas macho no copuladoras o en las inexpertas. Debido a que la teoría trófica predice que las regiones del cuerpo que poseen una mayor representación cortical tienen una mayor densidad de inervación, estas últimas observaciones sugieren que existen diferencias en la densidad de inervación genital entre ratas macho que despliegan distintos patrones conductuales copulatorios. Es por ello que en el presente trabajo evaluamos si el glande, principal transductor mecano-sensorial de los genitales, y el epidídimo, órgano efector final de la eyaculación, están distintamente inervados en ratas macho copuladoras y no copuladoras.

Capítulo 1. Antecedentes

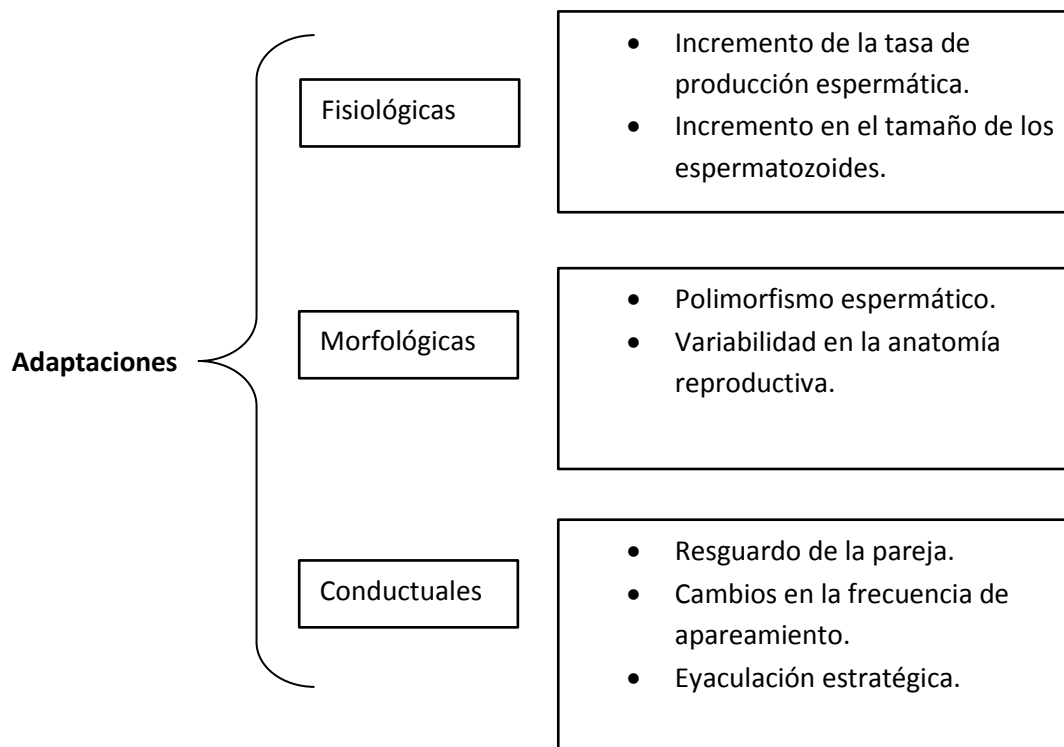
1.1. Competencia Espermática: Generalidades

En general, los organismos de todas las especies sexuadas tienen la disposición de aparearse con miembros del sexo opuesto. En contextos naturales, estos organismos se aparean con más de una pareja en periodos cortos de tiempo generando sistemas promiscuos como la poliginia y la poliandria (Emlen y Oring, 1977). Estos sistemas de apareamiento promiscuos, también conocidos como sistemas multimacho-multihembra (Jennions, 2000), dan como resultado a una forma de selección sexual post-cópula a nivel celular conocida como competencia espermática.

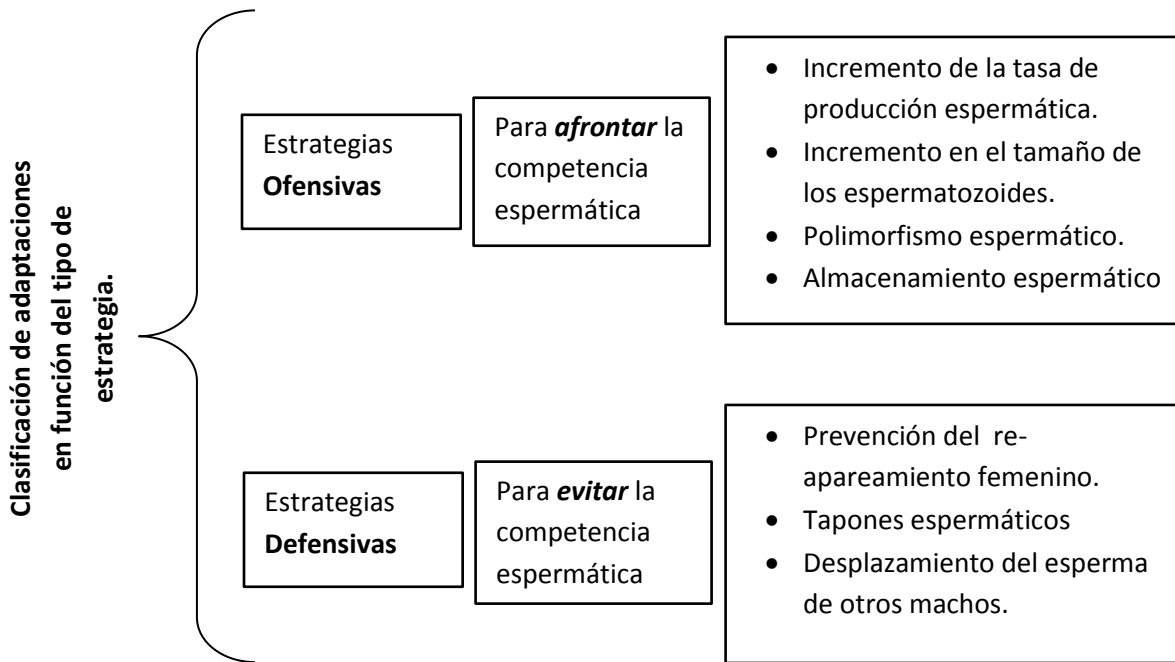
La competencia espermática se lleva a cabo cuando una hembra se aparea y es inseminada por dos o más machos, lo que permite la presencia simultánea de espermatozoides vivos de varios machos en el tracto reproductivo femenino. Estos espermatozoides compiten por la fecundación del gameto femenino (Parker, 1970). En muchas especies, la fertilización se lleva a cabo dentro del

tracto reproductor femenino, por lo tanto es la anatomía y fisiología del sistema reproductor femenino la que determina el ambiente en el que el espermatozoide de machos rivales competirá por la fertilización del óvulo (Suarez, 2006).

La competencia espermática ha sido reportada en aves (Birkhead, 1998), mamíferos (Gomendio, 1998), reptiles (Blengini, 2014), peces (Rasotto, 1998), anfibios (Byrne, 2002) e invertebrados (Parker, 1970). El hecho de que las hembras puedan aparearse con dos o más machos en un periodo corto de tiempo resulta en una gran presión evolutiva para los éstos. Esta situación ha conducido a la generación de un amplio repertorio de adaptaciones con las cuales, los machos, pretenden asegurar la paternidad de sus crías (Lukas, 2013). Estas adaptaciones se pueden clasificar en tres grandes rubros: fisiológicas, morfológicas y conductuales (Ver Cuadro 1). Complementando lo anterior, Wigby y Chapman (2004) clasificaron las adaptaciones en función del tipo de estrategia usada por los machos para enfrentar o evitar la competencia espermática (Ver Cuadro 2).



Cuadro 1. Resumen de las adaptaciones morfo-funcionales relacionadas con la evolución de la competencia espermática en los machos. (Elaborado con información de Parker y Pizzari, 2010)



Cuadro 2. Adaptaciones clasificadas en función del tipo de estrategia usada por los machos para contender en ambientes de competencia espermática (Wigby, 2010).

Dentro de las adaptaciones fisiológicas se han observado incrementos en la gametogénesis en función del nivel de competencia espermática (Parker, 2005). Esta adaptación fue identificada por primera vez en primates (Short, 1979) y desde entonces se ha encontrado en otros vertebrados, sugiriendo que el tamaño relativo de la masa testicular en relación con el tamaño del cuerpo es un índice que predice la estructura del sistema de apareamiento (i.e., grado de promiscuidad) y del nivel de competencia espermática.

Por otra parte se ha sugerido que la competencia espermática afecta la calidad del eyaculado. Así, se han reportado cambios en la motilidad, concentración y viabilidad espermática dependiendo del contexto de competencia. En general, los machos ajustan la calidad del esperma eyaculado (motilidad, concentración y viabilidad del esperma) en función del contexto de competencia (Fuentes-Morales, 2013).

Respecto a las adaptaciones morfológicas se puede mencionar que el diseño del esperma varía significativamente entre especies y la competencia espermática es un factor que influye esta variabilidad. Un ejemplo es el esperma del roedor *Apodemus sylvaticus* que está caracterizado por la presencia de un “gancho” en su cabeza. Estos ganchos, permiten concatenar de 50 a 100 espermatozoides que nadando en grupo incrementan su velocidad y fuerza de empuje con respecto a espermatozoides individuales. Estas asociaciones brindan una ventaja en la competencia espermática (Moore, 2002). En un estudio posterior llevado a cabo entre treinta y siete especies de roedores se determinó una fuerte asociación positiva entre la forma y curvatura del gancho apical del esperma y el nivel de competencia espermática inferido por la masa testicular relativa (Immler, 2007).

Otra teoría que trata de explicar la alta variabilidad entre gametos es la teoría kamikaze. Aunque no ha sido comprobada, la teoría kamikaze propone que las variaciones morfológicas que existen entre espermatozoides inseminados por el mismo macho no son el resultado de errores de producción durante la espermatogénesis, si no que éstas son adaptaciones a la selección post-cópula. Específicamente, proponen que existen dos amplias categorías de espermatozoides: los “atrapadores de ovocitos”, cuya función es la de fertilizar el ovocito, y los tipo “kamikaze” que con cabeza de forma ovalada han evolucionado para capacidades citotóxicas que les permiten matar o incapacitar al esperma de machos rivales (Baker, 1988).

La competencia espermática no sólo tiene el potencial de influenciar la morfología de células haploides sino que también afecta directamente la variabilidad anatómica de órganos sexuales reproductivos masculinos. Por ejemplo, la estructura peneana se encuentra taxonómicamente distribuida en distintas líneas evolutivas (insectos, aves, reptiles y mamíferos). La apariencia de éste órgano, sin embargo, varía ampliamente en tamaño, forma y elaboración; su diversificación es resultado de una selección evolutiva por el éxito de una óptima fertilización (Arnqvist, 1998). Un ejemplo, es el órgano copulador de la libélula macho que es usado simultáneamente para estimular a la hembra y a manera de cuchara con el fin para remover el esperma presente que ella ha obtenido de

cópulas previas (Codero-Rivera et al., 2004). En alguna especie de arácnidos una porción del órgano copulador, la *sclerita* apical, es desprendida durante la cópula permaneciendo en el tracto femenino como bloqueo y así previniendo la inseminación de machos rivales (Snow, 2005). Existe evidencia de una evolución rápida y divergente de los genitales, siendo ésta mayor en especies con sistemas de apareamiento promiscuo (Hosken & Stockley, 2004). Así mismo, otro grupo de investigadores encontraron diferencias morfológicas genitales entre tres especies de topos africanos de la misma familia. Estas diferencias correlacionaban con su estructura social, teniendo mayor dimorfismo sexual las especies con mayor intensidad de competencia espermática (Seney, 2009).

1.2. Adaptaciones conductuales relacionadas con la competencia espermática.

Con el fin de engendrar la mayor descendencia posible, los machos deben afrontar la presión selectiva que ejerce la promiscuidad femenina. Para esto, han desarrollado una amplia gama de estrategias reproductivas con el fin de incrementar las posibilidades de fertilizar los gametos femeninos. Algunas adaptaciones conductuales son las siguientes:

- a) **Modificación en la frecuencia de apareamiento:** Los machos pueden ajustar la frecuencia de intromisiones muy por encima de las necesarias para fecundar a una hembra (Martínez & Paredes, 2001). Una cópula prolongada puede funcionar para desplazar el esperma de machos rivales, para transferir mayor número de espermatozoides, y en algunas especies, para dar tiempo a que se forme un tapón espermático que sirva como barrera contra futuras inseminaciones (Bretman, 2011; Olsson, 2001).
- b) **Eyaculaciones Múltiples:** Repetidas eyaculaciones con la misma hembra puede ser una estrategia para asegurar el éxito de la fertilización (Parker, 1984). Estudios han asociado intervalos post-eyaculatorios más cortos en

un contexto con alto nivel de competencia espermática (Stockley & Preston, 2004).

- c) Resguardo de la pareja: Los machos pueden evitar la competencia espermática al prevenir que las hembras copulen con machos rivales. La vigilancia de la pareja puede ocurrir después de la cópula para asegurar la fertilización. Por mencionar un ejemplo, la golondrina macho (*Hirundo rustica*) aparta a su pareja mientras ésta es fértil y ajusta el número de cópulas en función del número de machos rivales (Møller, 1987). Los machos también pueden desplegar conductas agresivas a otros machos que intenten acercarse a la hembra en cuestión (Craig, 1921; Dixon, 1995).

Capítulo 2. Modelos teóricos de competencia espermática

Existe evidencia de que los machos ajustan la calidad y cantidad del contenido eyaculatorio en respuesta a condiciones locales competitivas (delBarco-Trillo y Ferkin, 2007; Ramm y Stockley, 2007; Rudolfsen, 2006). Aunque se desconoce la neurofisiología que regula la asignación espermática en contextos competitivos, surgieron modelos teóricos de competencia espermática para predecir estrategias evolutivamente estables en referencia a los ajustes al volumen expelido y al número de espermatozoides que se inseminan dependiendo el grado de competencia en el que se realicen los encuentros copulatorios (Ver Cuadro 3).

En el modelo de optimización se identifican dos factores que son necesarios para desempeñar un gasto energético reproductivo exitoso. El primer factor es el número de espermatozoides disponibles para el eyaculado; se asume que el resultado de la competencia espermática depende del número de espermatozoides que alcance el sitio de fertilización el cual se presume proporcional al número de espermatozoides eyaculados por cada macho. En este caso, tendrá mayor posibilidad de éxito reproductivo el macho con mayor número de espermatozoides depositados (Parker, 1982). Sin embargo, el costo de producción del esperma es elevado y tanto el número de eyaculaciones que un macho puede producir como el tiempo para abastecer sus reservas agotadas es limitado

(Dewsbury, 1982). Existe evidencia que sugiere que el agotamiento de reservas espermáticas puede ser un factor importante que limite el éxito reproductivo masculino en poblaciones naturales (Preston, 2001).

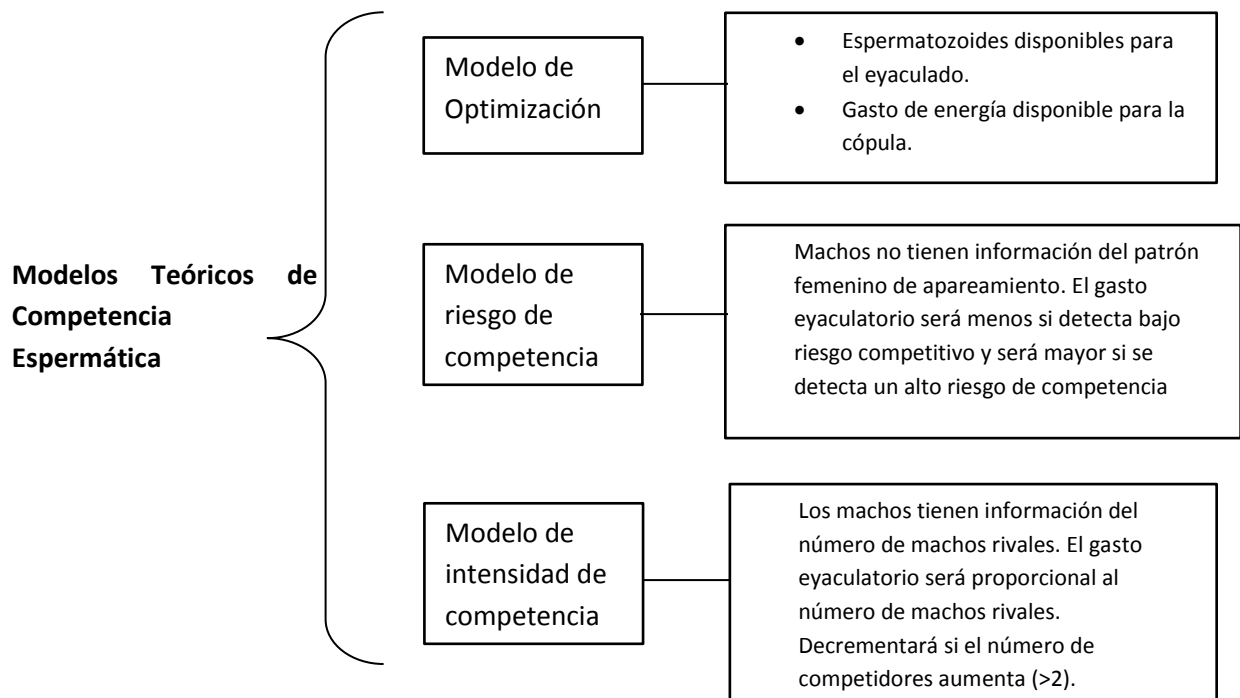
El segundo factor del modelo de optimización es el gasto de energía disponible para la cópula. Este factor involucra al gasto energético necesario para cortejar, vigilar a la hembra, así como para involucrarse en enfrentamientos con otros machos y obtener acceso a la hembra. Estos recursos, i.e. el número de espermatozoides y el gasto energético, son bastante limitados y se espera que los machos destinen eyaculaciones con prudencia y selección para maximizar el éxito reproductivo a través de un equilibrio óptimo entre la inversión del gasto eyaculatorio y otros aspectos del esfuerzo reproductivo como la búsqueda de hembras (Parker & Maynard-Smith, 1990).

Posteriormente se desarrollaron otros modelos bajo la lógica de evaluar el riesgo y la intensidad de competencia espermática, ya que estos modelos involucran la habilidad del macho de discriminar los niveles de promiscuidad femenina y el número de machos rivales compitiendo por la fertilización (Parker et al., 1997).

En el modelo de riesgo de competencia los machos pueden no tener información del patrón femenino de apareamiento, pero pueden inferir que la hembra copuló previamente o que posiblemente copulará con otro macho. Lo que el modelo de riesgo de competencia predice es que cuando el macho detecte un bajo riesgo de competencia el gasto del eyaculado será lo mínimo necesario, es decir el macho inseminará un menor número de espermatozoides. En contraste, cuando el macho evalúe un alto riesgo de competencia incrementará el gasto eyaculatorio (Parker et al., 1997). Aunque se desconoce la naturaleza de la información que los machos rivales utilizan para desencadenar cambios adaptativos en los parámetros del eyaculado, se piensa que en roedores señales olfativas (i.e. feromonas; Vosshal, 2005) y señales acústicas (i.e. vocalizaciones ultrasónicas copulatorias – 22 kHz/50kHz-) de machos rivales son suficientes para provocar cambios en el número de espermatozoides inseminados (Pound & Gage, 2004; Gutiérrez-García, 2002).

El modelo de intensidad de competencia espermática, originalmente fue ideado para especies que usan fertilización externa y puede ser aplicado a aquellas especies con fertilización interna pero con alta competencia espermática. Lo que predice el modelo es que durante un alta intensidad de competencia espermática, el gasto eyaculatorio será proporcional al número de machos rivales y éste decrementará si el número de machos competidores aumenta por encima de dos rivales. Por lo tanto este modelo asume que el macho tiene certeza sobre el nivel de promiscuidad de la hembra (Parker & Bergon, 1993).

Estos modelos pronostican el gasto eyaculatorio en función de una evaluación del ambiente socio-sexual. Sin embargo, no realizan ninguna predicción respecto a otras formas de desempeño conductual en contextos competitivos (por ejemplo, cambios en las latencias eyaculatorias) y asumen que machos de distintas especies se comportarán de la misma forma sin considerar a fondo las variaciones fenotípicas interindividuales inherentes a una población.



Cuadro 3. Resumen de los modelos teóricos de competencia espermática (Parker, 1997).

2.1. Cambios conductuales no contemplados por los modelos de competencia espermática.

En mamíferos, la expresión de la conducta copulatoria consiste en patrones motores secuenciales de monta, intromisión y eyaculación (Lucio, 2008). Se define a la monta como el momento en el que el macho se alza sobre sus cuartos traseros y sujeta a la hembra por sus flancos provocándole el reflejo de lordosis. Consecuentemente el macho realiza movimientos pélvicos intromitiendo el pene en la vagina hasta alcanzar la eyaculación. Los parámetros copulatorios consisten en la cuantificación del número y duración de montas, intromisiones y eyaculaciones. Algunos estudios experimentales han relacionado la competencia espermática con cambios en parámetros conductuales y han observado que estos parámetros se ven afectados por la presencia de un macho rival (Zajonc, 1965; Stockley & Preston, 2004; Ambriz, 2002).

En primates y roedores se ha observado una disminución en la latencia de eyaculación de un 53 % si estos copulaban en presencia de otros machos así como una disminución en latencias de monta y un aumento en la frecuencia de intromisión (Dixon, 1995; Preston & Stockley, 2006). Una de las posibles ventajas que conlleva el ajuste de la latencia de eyaculación es la de transferir con mayor rapidez espermatozoides, y a su vez reducir el riesgo de perder oportunidades reproductivas, como el rechazo de la hembra o recibir la agresión de un macho dominante, en caso de pertenecer a un grupo jerarquizado (Craig, 1921).

Por lo tanto la competencia espermática no solo provoca que los machos ajusten cambios en la calidad del eyaculado (i.e., movilidad espermática, número de espermatozoides inseminados; Fuentes-Morales, 2013), sino que también es un factor que provoca que los machos ajusten cambios en la expresión de patrones copulatorios como la latencia de eyaculación (Ver Figura 1) (Dixon, 1995; Preston & Stockley, 2006; Pichardo-Cruz, 2015; Bretman, 2011).

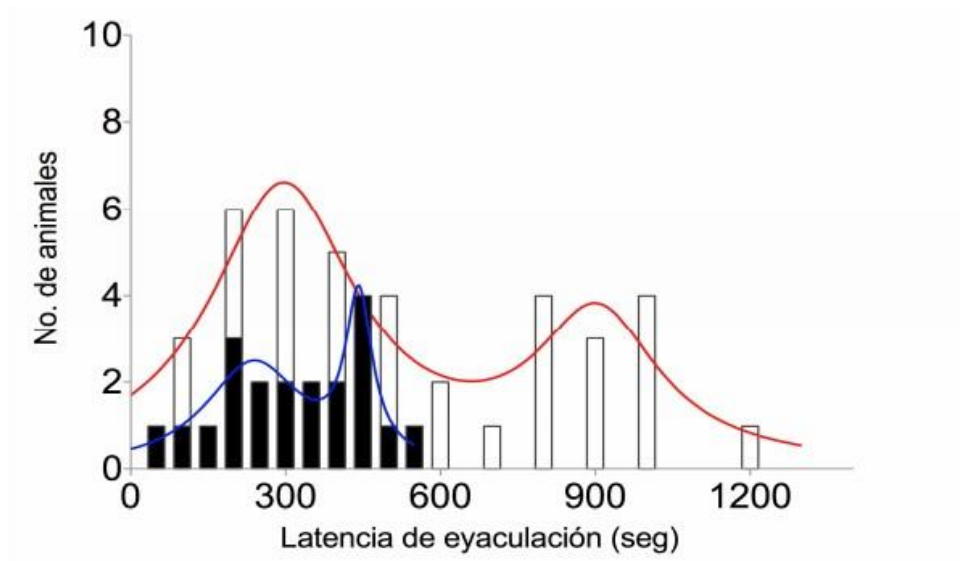


Figura 1. Histograma de la distribución de las frecuencias de latencia de eyaculación de ratas machos en contextos monoándricos o biándricos (competitivos). Las barras blancas representan la distribución de las latencias antes de los enfrentamientos (Monandria); Las barras negras muestran el cambio en la distribución de las latencias en enfrentamientos biándricos (Pichardo-Cruz, 2015).

Capítulo 3. Fenotipos copulatorios en la rata macho

La expresión de la conducta copulatoria varía significativamente entre machos de la misma especie. Se ha descrito un fenotipo que es incapaz de realizar la cópula aun cuando se encuentre con hembras receptivas; este fenotipo no copulador corresponde al 1-2% de la población (Portillo et al., 2006). Estas ratas conocidas como no copuladoras representan una variante natural dentro del espectro de la conducta sexual masculina y pueden dar ayuda para encontrar factores involucrados en la expresión de la conducta sexual masculina en ambientes competitivos. Estudios realizados en ratas macho no copuladoras encontraron que el núcleo preóptico medial, un núcleo hipotalámico necesario para el despliegue de la conducta copulatoria masculina, posee una menor cantidad de

células con receptores α a estrógenos, en contraste con el número de células inmunopositivas halladas en ratas macho copuladoras (Portillo et al., 2006). Adicionalmente, se encontró que ratas macho copuladoras y no copuladoras tenían niveles similares de testosterona en plasma sanguíneo, sin embargo, los machos no copuladores poseían una menor actividad de la enzima aromatasa en el núcleo preóptico medial (Portillo et al., 2007). Por lo que a nivel sistema nervioso central existen diferencias en la biodisponibilidad de testosterona y sus metabolitos entre ratas macho copuladoras y no copuladoras.

Posteriormente, estudios realizados con el objetivo de dilucidar problemas relacionados a la eyaculación precoz en humanos observaron diferencias endofenotípicas estables entre latencias de eyaculación en ratas Wistar. Estos experimentos observaron que existe una distribución Gaussiana en patrones copulatorios de machos Wistar y categorizaron tres distintos fenotipos con base a sus frecuencias de eyaculación (FE), contabilizadas en cuatro pruebas conductuales de 30 minutos cada una. El fenotipo lento (0-1 eyaculación), el fenotipo normal (1-3 eyaculaciones) y el fenotipo rápido (3 o más eyaculaciones). De esta manera, en una población de ratas Wistar los machos presentan uno de tres fenotipos: rápido, normal o lento (Pattij et al., 2005). En complemento con estos hallazgos otros estudios encontraron diferencias neurofisiológicas en el mecanismo espinal que controla la fase de expulsión de la eyaculación (Borgdorff, 2009). Aplicando micro-estimulación directamente en el generador espinal de la eyaculación (SGE, por sus siglas en inglés) que reside en el área lumbar espinotalámica (Truitt, 2002; Allard, 2005), encontraron que la fase de expulsión comenzaba y terminaba 3 segundos (7.0 ± 0.54 s) antes en ratas de fenotipo rápido mientras las duraciones de los otros dos fenotipos permanecían igual (Borgdorff, 2009).

Otro antecedente de diversidad fenotípica en la rata macho fue un estudio realizado en nuestro laboratorio en el que se mapeo la zona correspondiente a la representación cortical de los genitales en las ratas macho (Ver Figura 2). Se mostró, mediante el uso de marcadores para actividad neural (i.e., c-fos y citocromo oxidasa), que la corteza somato sensorial primaria contiene una sub-

representación de los genitales ubicada en la región dorso-medial de la sub-representación del tronco. En este estudio también se observó que la representación cortical de los genitales varía entre individuos (Esquivel-Franco, 2014). Además, experimentos en curso realizados en nuestro laboratorio documentaron que los machos copuladores poseen representaciones corticales de los genitales que son de menor tamaño en comparación de aquellas observadas en ratas macho no copuladoras. Debido a que la teoría trófica (ver abajo) predice que las regiones del cuerpo que poseen una mayor representación cortical tienen una mayor densidad de inervación, estas últimas observaciones sugieren que existen diferencias en la densidad de inervación genital entre ratas macho que despliegan distintos patrones conductuales copulatorios.

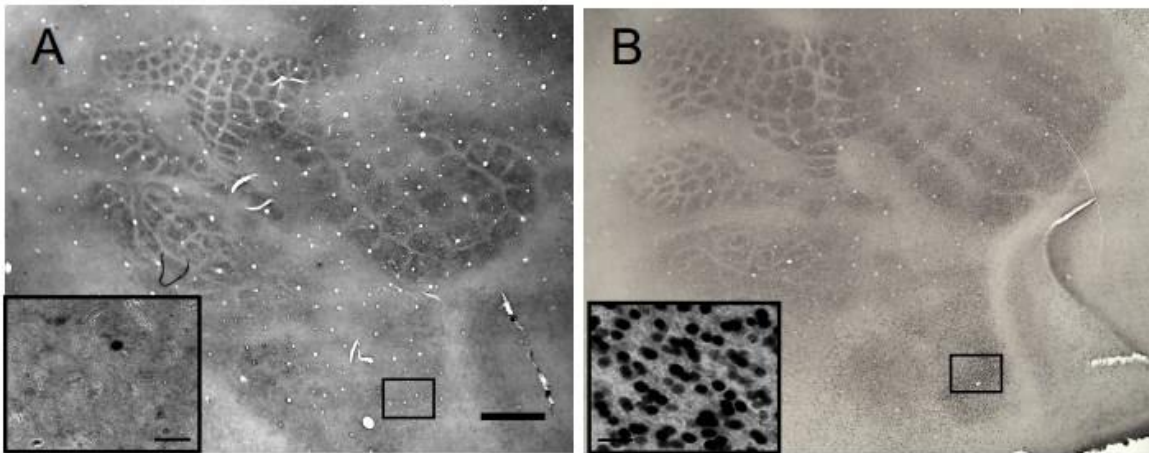


Figura 2. Microfotografías que muestran una imagen representativa de la inmunotinción para c-Fos en el área que corresponde a la sub-representación de los genitales bajo condiciones de anestesia (A) y sin anestesia (B), en ratas macho cuyos genitales fueron estimulados. Nótese el incremento de la marca nuclear y en la cantidad de núcleos marcados en el área dorso-medial de la sub-representación del tronco en las ratas estimuladas. Escala en A y B= 1mm. Escala en magnificaciones= 25 μ m. (Esquivel-Franco, 2014).

3.1. Teoría trófica: inervación-representación.

Se sabe que el cuerpo está representado repetidamente dentro del sistema nervioso creando mapas topográficos (Ver Figura 3). Estos mapas son preservados a través de las conexiones sinápticas que se dan entre el cuerpo y el sistema nervioso central.

En estas representaciones, las estructuras somáticas que están densamente inervadas por terminales nerviosas ocupan una mayor proporción de los mapas somáticos sensoriales y motores (Penfield, 1950). Estos mapas no son estables ya que son susceptibles a cambios por diversos tipos de eventos a lo largo del desarrollo (Fetter-Pruneda et al., 2012; Purves et al., 1994; Van der Loos et al., 1970). Por lo tanto, las modificaciones en las representaciones somáticas corticales son el resultado de una reestructuración sináptica en el sistema nervioso periférico (Purves, 1988).

De igual forma, estudios han mostrado que existen modificaciones en la representación somato sensorial en respuesta de requerimientos funcionales. En general, estas modificaciones se observan como expansiones de las áreas destinadas al procesamiento de información proveniente de las partes del cuerpo que incrementan su funcionalidad.

A manera de ejemplo, se encontró que la representación cortical de los dígitos de la mano izquierda ocupa una mayor parte en el cerebro de los violinistas y pianistas en comparación con personas que no tocan ningún instrumento (Elbert et al., 1995; Hyde et al., 2009). De acuerdo a lo mencionado anteriormente existen modificaciones en la representación cortical en función a la densidad de inervación, crecimiento corporal durante el desarrollo y a cambios funcionales causados por demandas ambientales.

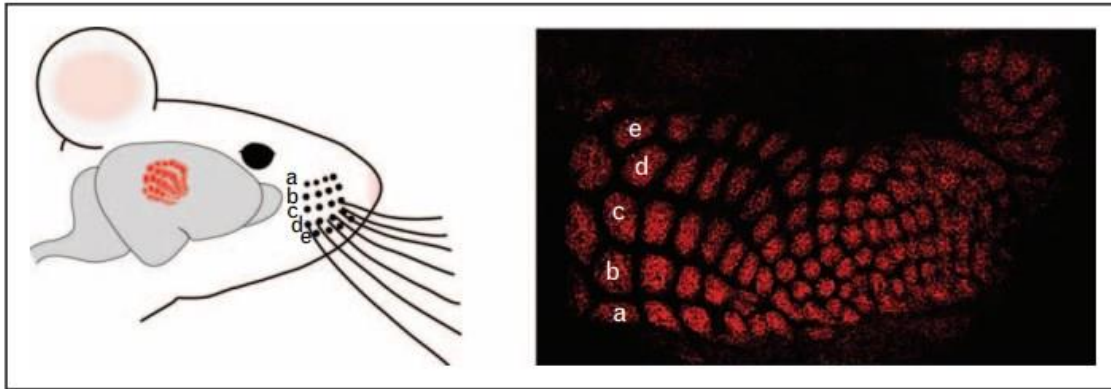


Figura 3. La corteza somatosensorial primaria de roedores posee un mapa formado por módulos de columnas celulares denominados barriles que son sujetos a cambios dependiendo de cambios en la inervación. Cada barril representa conjuntos de mecano-receptores sensoriales localizados por debajo de la superficie corporal y cada barril responde a la estimulación de un único bigote. En la foto derecha el campo de barriles está marcado con anticuerpos contra el transportador vesicular de glutamato (VGlut2) que revelan el blanco de axones tálamo-corticales. Cada letra (a, b, c, d, y e) representa el inicio de una fila de vibrisas y su representación biunívoca con los barriles corticales en rojo. (Pouchelon & Jabaudon, 2014)

Capítulo 4. Epidídimo y glande como efectores en la fisiología de la eyaculación.

La eyaculación, definida como la expulsión de espermatozoides y fluidos seminales a través del meato uretral, es esencialmente un reflejo espinal desencadenado por estimulación genital y cerebral. En humanos el proceso consta de tres fases: emisión, expulsión y orgasmo (Sachs, 2006). El reflejo eyaculatorio es coordinado por el núcleo generador espinal eyaculatorio (GEE), el cual es conformado por un grupo de neuronas localizadas en la medula espinal al nivel de las vértebras torácicas y lumbares T12–L1–L2 (Truitt, 2002). El GEE se activa al recibir la información asociada con la estimulación mecánica de los genitales y envía información a sus órganos efectores a través de nervios autonómicos simpáticos (i.e., adrenérgicos) y parasimpáticos (i.e., colinérgicos) que se activan de forma integral y coordinada para efectuar la fase de emisión y expulsión. Específicamente, las fibras simpáticas controlan la secreción de fluidos seminales de células epiteliales y glándulas accesorias sexuales mientras que la actividad de

neuronas adrenérgicas originadas en el plexo pélvico provocan la contracción del cuello de la vejiga (para evitar el flujo retrogrado del semen), así como la contracción de vesículas seminales, epidídimo y *Vas deferens* para facilitar el transporte distal de espermatozoides. Estas contracciones trabajan en coordinación para transportar el semen hasta la uretra posterior provocando la sensación de inevitabilidad y activando los centros mecánicos de la médula sacra (S2-S4) a través del nervio pudendo (Setchell, 2006).

La activación del nervio pudendo da inicio a la fase de expulsión provocando la contracción rítmica de tejido muscular liso y estriado que rodea la uretra. Esta red de músculos se conforma por el musculo bulbocavernoso, el esponjiforme y el perineo que juntos impulsan el eyaculado hasta la uretra distal (Allard, 2005).

El reflejo eyaculatorio es iniciado principalmente por receptores sensoriales ubicados en el glande. La información recibida a través de las terminaciones sensoriales viaja por las fibras sensoriales del nervio dorsal del pene y del nervio pudendo hasta la médula espinal. Las terminaciones nerviosas de la dermis peneana, prepucio y glande son la mayor fuente de input sensorial, aunque el nervio cavernoso también contribuye al input de estructuras internas como los cuerpos cavernosos (Steers, 2000). La información sensorial hace relevo en sitios supraespinales por las vías espino talámica y espino reticular. Las fibras de la vía espinotalámica transmiten de manera más rápida los potenciales generados por las terminales nerviosas del pene ya que son fibras mielinizadas, estas fibras terminan en el núcleo postero-lateral del tálamo y subsecuentemente al núcleo medial del tálamo para subir a la corteza cerebral en la línea media de la fisura inter-hemisférica donde se mapean los genitales (Georgiadis, 2012).

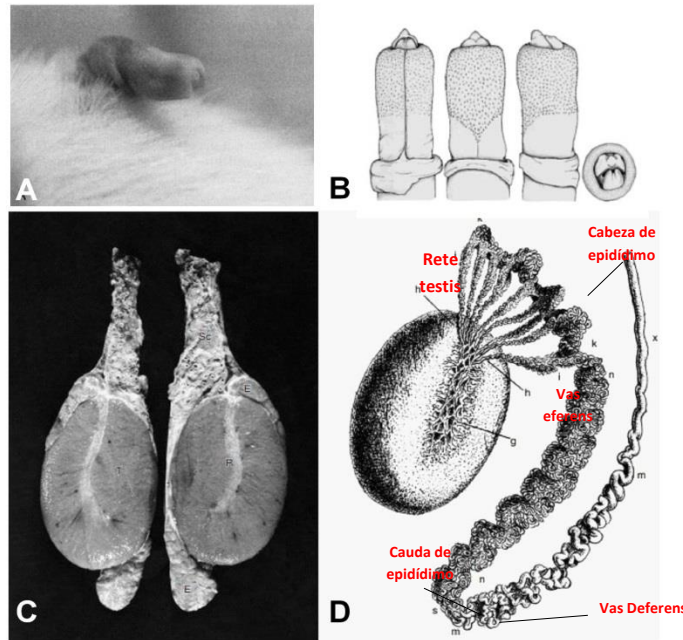


Figura 4. Anatomía genital de la rata macho. (A) Fotografía del pene de la rata macho en estado flácido. (B) De izquierda a derecha: vista ventral, dorsal, lateral y coronal del glande en roedores. (C) Corte longitudinal de testículos y caudas de epidídimo. (D) Dibujo de un testículo mostrando la rete testis, vas eferens, cabeza, cuerpo y cauda del epidídimo y ducto deferente. (Knobil, 2006)

La finalidad del proceso eyaculatorio es la expulsión del contenido espermático, desde sus reservorios en el epidídimo hasta el punto de fertilización donde se encuentra el ovocito. El epidídimo es un órgano tubular extra-testicular encargado del almacenamiento, capacitación y expulsión de los espermatozoides. Es un túbulo largo enrollado en sí mismo que se divide en tres principales compartimentos denominados cabeza, cuerpo y cauda. La cabeza y el cuerpo están escasamente innervados y transfieren espermias inmóviles a lo largo de su luz con la ayuda de contracciones musculares peristálticas (Sachs, 2006). Por el contrario, la cauda se encuentra ricamente innervada por fibras adrenérgicas que coordinan la actividad muscular contráctil necesaria para llevar a cabo la fase de emisión (Shalender-Bhasin, 2006). Por la función de almacenamiento y maduración de las células espermáticas y al mismo tiempo ser el efector final de la fase de emisión de la eyaculación, se ha postulado que la cauda del epidídimo tiene un papel importante en la competencia espermática (Jones, 2007) (Ver Figura 4).

Capítulo 5. Planteamiento del problema

5.1. Justificación

Ya que los machos presentan diferencias en su capacidad copulatoria y entre ellos existen diferencias en la representación cortical de los genitales, se torna necesario conocer si las diferencias en el desempeño copulatorio reflejan diferencias en la inervación de los genitales. Específicamente, evaluamos el glande y epidídimo, pues la estimulación mecánica del primero es necesaria para iniciar el reflejo eyaculatorio, mientras que el segundo es el órgano efector final de la fase de emisión eyaculatoria.

5.2. Objetivo General

Determinar si existen diferencias en la cantidad de inervación en el epidídimo y el glande de ratas adultas macho que expresan los fenotipos no copuladores y copuladores.

5.3. Objetivos Específicos

- Determinar el fenotipo de las ratas macho con base en su desempeño en las pruebas copulatorias.
- Estimar el área inervada por las fibras nerviosas catecolaminérgicas y colinérgicas en el glande y el epidídimo de ratas copuladoras y no copuladoras.

5.4. Hipótesis

- Ho: El área ocupada por la inervación en el glande y el epidídimo no será de mayor tamaño en las ratas macho copuladores que en los no copuladores.
- Ha: El área ocupada por la inervación en el glande y el epidídimo será de mayor tamaño en las ratas macho copuladores que en los no copuladores.

5.5. Variables

Variable independiente categórica: Fenotipo copulatorio

Variable dependiente cuantitativa: Cantidad de inervación

Capítulo 6. Materiales y métodos

6.1. Animales

Para realizar estos experimentos se utilizaron ratas de la cepa Wistar (n=20) de entre 10-12 semanas de edad con peso de 390g (\pm 54.3g). Las ratas de fenotipo no copulador (n=7) fueron obtenidas del bioterio del Centro de Ciencias de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala mientras que las ratas copuladoras (n=7) y las ratas sin experiencia sexual (n=6) fueron obtenidas del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas en la vieja sede (IIB, UNAM). Los animales se alojaron individualmente en cajas de policarbonato (46cm x32cm x 20cm) a una temperatura de 21°C (\pm 1) con un ciclo de iluminación de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad con acceso *ad libitum* al alimento. Todos los procedimientos cuentan con la aprobación de la comisión de ética para el manejo de los animales de experimentación del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM).

Para categorizar a los animales se realizaron pruebas copulatorias que consistieron en colocar a un macho con una hembra en una arena de observación. Los indicadores conductuales que se registraron fueron el número de montas (NM), el número de intromisiones (NI) y eyaculación. También se obtuvieron la latencia de monta (LM, tiempo transcurrido en segundos desde el inicio de la prueba hasta la observación de la primera monta o intromisión) y latencia de la eyaculación (LE, tiempo transcurrido en segundos desde la primera intromisión hasta la observación de la eyaculación). Para las pruebas conductuales fue necesario el uso de ratas hembras ovariectomizadas (n=20). Las hembras se mantuvieron bajo las mismas condiciones de iluminación y alimentación que los machos, aunque éstas fueron alojadas en grupos de cinco por caja. Se indujo hormonalmente el estro mediante inyecciones subcutáneas de 17 β estradiol (10 μ g; Sigma-Aldrich; 48 horas antes de la prueba copulatoria) y progesterona (2 mg; Sigma-Aldrich; 4 horas antes de la prueba copulatoria). Los machos no copuladores no realizaron ninguna cópula en las 4 pruebas copulatorias realizadas en la Universidad Autónoma de Tlaxcala, mientras que los

machos copuladores fueron sementales obtenidos del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

6.2 Obtención, medición y procesamiento de las muestras.

Al final de las pruebas conductuales (30 min), todos los animales fueron sacrificados mediante una sobredosis de pentobarbital sódico (45mg/kg de peso corporal) antes de obtener las muestras del cerebro, epidídimos y glandes. Los machos fueron perfundidos intracardialmente utilizando 200 ml de NaCl al 0.9% y fijados con 200 ml de paraformaldehído (PFA) al 4% en PB al 0.1 M. Una vez extraídos los órganos de interés, éstos fueron post-fijados en PFA al 4% por 24 horas y pesados mediante una balanza digital (Adventurer-Ohaus, USA). Al finalizar estas mediciones las estructuras fueron deshidratadas en amortiguador de fosfatos-sacarosa (PBS) al 10, 20 y 30% pH 7.4 y se mantuvieron a 4°C. En particular, el glande se obtuvo a partir de penes disecados mediante un par de incisiones llevadas a cabo a ambos a ambos lados de este órgano. Después de su liberación al realizar un corte transversal a nivel de la flexura peneana. Posteriormente el glande fue retirado del *baculum* mediante una incisión media realizada a lo largo del glande. Ambas caras del glande se aplanaron colocándolas entre dos laminillas separadas por 1 milímetro. Estos glandes aplanados fueron post-fijados en una solución de PFA al 4% en PBS durante 24 horas y después fueron pasados a soluciones de sacarosa al 10, 20 y 30% en PBS. Las muestras fueron congeladas durante 10 minutos en 2-metilbutano (Grado HPLC, Sigma-Aldrich) pre enfriado con hielo seco y se mantuvieron a -80°C hasta su uso.

6.3. Inmunohistoquímica contra fibras catecolaminérgicas y colinérgicas

Los cortes de las muestras se realizaron de forma longitudinal a un grosor de 20 µm en un criostato. Los cortes se colectaron en laminillas previamente gelatinizadas montando 1 de cada 3 cortes y almacenándolos a -4°C hasta su procesamiento. Posteriormente se realizaron dos lavados con amortiguador de fosfatos (PB) 0.1M pH 7.4 durante 10 minutos cada uno, seguido de la inhibición de la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 1 % por 5 minutos. Se realizaron dos

lavados con PB 0.1 M pH 7.4 adicionado con Triton X-100 (PBT) al 0.5% y fueron incubados con Inmuno/DNA Retriever (Bio SB Inc. Santa Barbara California, USA) a 70°C por 30 minutos. Posteriormente se realizaron dos lavados con PBT 0.5% 0.1M pH 7.4 y la incubación del anticuerpo policlonal de borrego contra tirosina-hidroxilasa (TH; 1:1000 Chemicon AB1542) en PBT 0.5% 0.1M por 12 horas a temperatura ambiente. Finalizando el tiempo de incubación, los cortes se lavaron 3 veces con PBT 0.5% 0.1M pH 7.4 cada 5 minutos. Posteriormente, los cortes se incubaron con el anticuerpo secundario burro anti-borrego (1:250 Dky X Sh IGg Biotin, Millipore 92590) en PBT 0.5% 0.1M pH 7.4 a temperatura ambiente por dos horas. Los tejidos se lavaron con PBT 0.5% 0.1M dos veces por 5 minutos y se incubaron con el complejo avidina-biotina peroxidasa en PB 0.1M pH 7.4 por 90 minutos a temperatura ambiente (ABC-Kit, Vector Laboratories). Finalmente, después de 3 lavados con PB 0.1M pH 7.4, la reacción histoquímica para la enzima peroxidasa fue revelada mediante la incubación y la precipitación de 3,3'-diaminobencidina (DAB, Vector Laboratories) intensificada con níquel, todo esto durante cinco minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo lavando con PB para finalmente montar las laminillas con Cytoseal 60 (Richard-Allan Scientific).

Para la visualización de fibras colinérgicas se realizó el mismo protocolo descrito anteriormente. A diferencia de aquel, los cortes fueron incubados con anticuerpos policlonales dirigidos contra la enzima acetil-colín transferasa (A[°]1 ChAt; 1:500; Mouse Chemicon MAB 305,) a temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente los cortes fueron incubados con el anticuerpo secundario biotinilado producido en ratón (1:500 Dky x mouse, Millipore,) por 3 horas a temperatura ambiente y revelados con 3,3'-diaminobencidina como se describió anteriormente.

6.4. Conteo de fibras nerviosas inmuno-positivas.

Se tomaron microfotografías en la Unidad de Microscopía del IIB con el microscopio OLYMPUS BX51WI acoplado a una unidad de disco giratorio (DSU) usando el objetivo de 20x y usando como interfaz el software StereoInvestigator® (MBF Bioscience and Neuron Reconstruction, Williston, USA). Se realizaron capturas automáticas mediante el módulo *Virtual Slice* generando lienzos de las regiones anatómicas de interés. Se tomaron un total de 15 fotomicrografías por cauda de epidídimo y por glánde de cada animal a una resolución de 1600 x 1200 píxeles. Se analizaron 600 fotografías en total.

El conteo de fibras inmuno-positivas se llevó a cabo mediante el programa Image Processing and Analysis in Java (Image-J, NIH, USA). Se calibró el programa con una relación de píxeles/micras de 2.4954 píxeles por micra, dando un total de 308,325 μ^2 . Las imágenes obtenidas con el microscopio fueron transformadas a 8-bits y se segmentaron manualmente hasta que las fibras nerviosas quedaran destacadas (Figura 5); el programa identifica en color rojo el área que se cuantificará. Posteriormente, para realizar el conteo de las fibras, se le indicó al software Image-J los parámetros que se requieren para evaluar la morfología, éstos fueron los promedios (\pm Desviación Estándar) del área, el perímetro y los descriptores de forma; los resultados fueron obtenidos directamente en micras (μ).

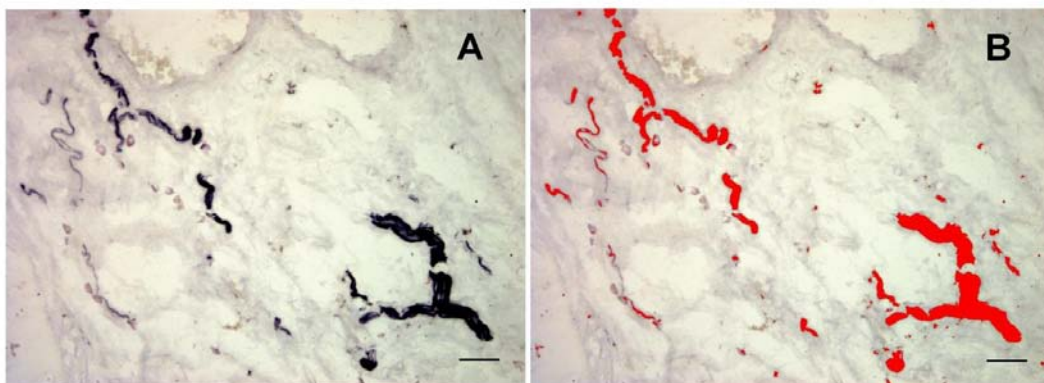


Figura 5. Fotomicrografías representativas del proceso de cuantificación de fibras con el programa ImageJ. (A) Microfotografía de glánde dónde aparecen de color oscuro las fibras nerviosas marcadas con el anticuerpo para Neurofilamento 200kD (NF-200kD). (B) Es la misma imagen que (A) pero las fibras fueron seleccionadas por el software transformándolas en rojo. El software reconoce el área roja como área seleccionada para realizar la cuantificación arrojando el resultado en micras cuadradas. Escalas en A y B indican 50 micras.

6.5. Análisis estadístico.

El conjunto de los datos obtenidos fueron capturados en Excel (Office 8, Microsoft) y todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa Prism Graph Pad® para Windows 8 (Versión 6.0, GraphPad Software Inc.). Los datos se presentan como media \pm desviación estándar. La normalidad de los mismos fue ensayada con la prueba Saphiro-Wilk. Debido a que la distribución de los datos fue normal pero el tamaño muestral por grupo es reducido, la significancia estadística ($p < 0.05$) de la diferencias de los grupos se ensayó con la prueba de Kruskal-Wallis y entre grupos se definió con la prueba *Post-hoc* de Dunn ($p < 0.05$).

6.6. Diseño experimental.

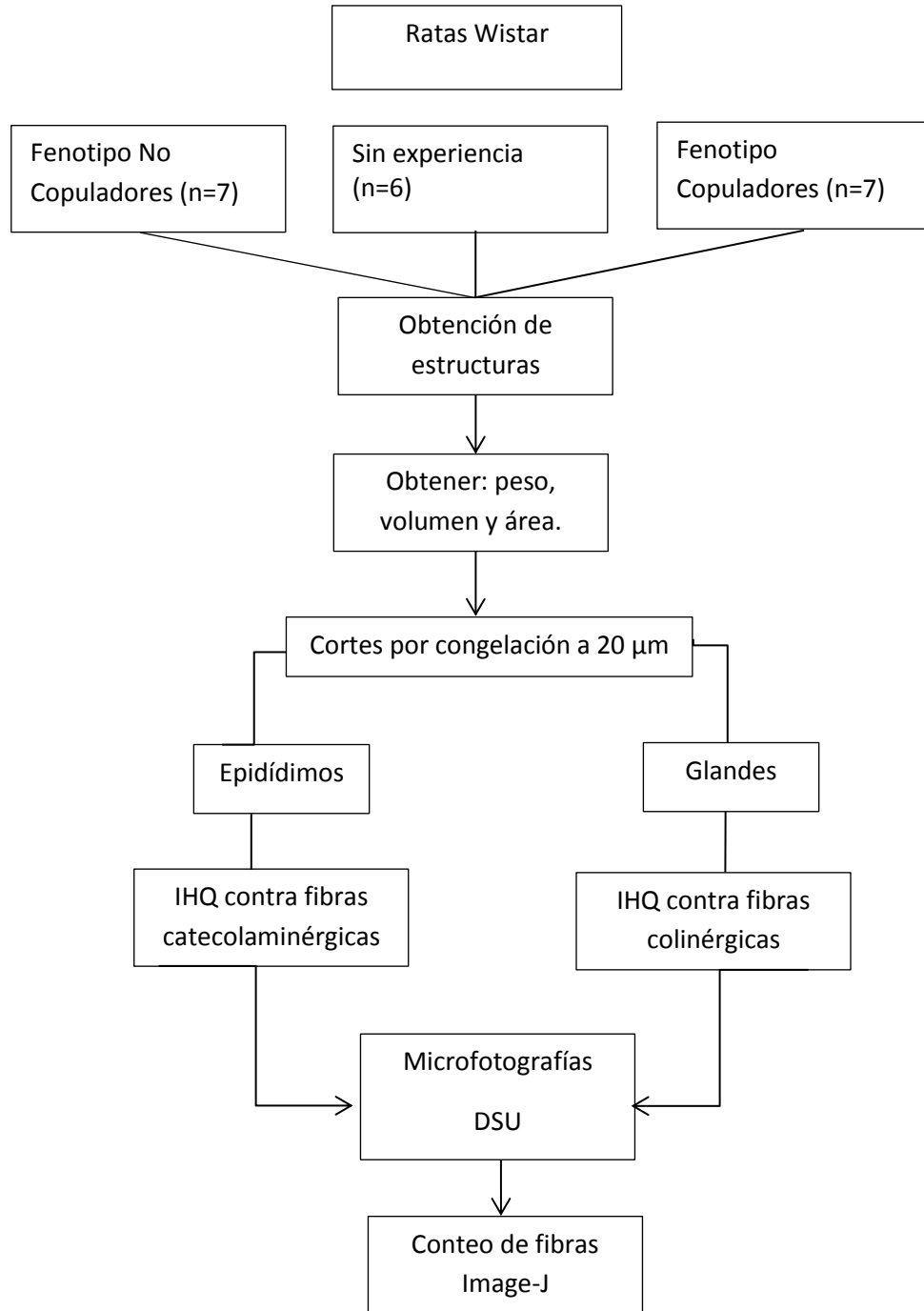


Figura 6. Diseño experimental. En este diagrama de flujo se muestran el diseño experimental para la obtención de los fenotipos copulatorios (no copulador, copulador y sin experiencia) y el procedimiento llevado a cabo para la obtención y cuantificación de fibras nerviosas en la cauda de epidídimo y glándula.

Capítulo 7. Resultados

7.1. El peso de la cauda de epidídimo y la relación peso corporal/peso pene difieren entre los fenotipos no copulador y copulador (Cuadro 1)

Tanto el peso corporal como el peso de la cauda del epidídimo, pero no el del pene, de las ratas macho copuladoras fue significativamente mayor que aquellos observados en las ratas no copuladoras o sin experiencia sexual. La relación peso corporal / peso de la cauda del epidídimo no difirió entre los tres grupos de ratas. En contraste, la relación peso corporal / peso del pene fue significativamente mayor en los no copuladores y en los machos sin experiencia que en los copuladores.

Grupo (n)	Peso Corporal (g)	Peso cauda Epidídimo (g)	Relación Peso corporal/peso cauda	Relación Peso corporal /peso pene
No Copuladores (7)	375.7 ± 39.840*†	0.307 ± 0.019 **	0.08471 ± 0.009394	0.04641 ± 0.008
Copuladores (7)	450 ± 36.170	0.399 ± 0.072	0.08814 ± 0.01054	0.03346 ± 0.004**
Sin Experiencia (6)	354.2 ± 18.810*	0.292 ± 0.026**	0.0825 ± 0.00582	0.04314 ± 0.005*

Cuadro 1. Comparación entre el peso corporal, peso de la cauda del epidídimo, de la relación peso corporal/peso de la cauda del epidídimo y de la relación peso corporal / peso del pene entre los tres grupos de ratas macho evaluados. Datos representados como media ± D.E.; Kruskal-Wallis seguida de la Prueba *posthoc* de comparaciones múltiples de Dunn: Copuladores versus No Copuladores † o Sin experiencia *p<0.05, **p<0.01,

7.2 Los machos copuladores muestran un porcentaje de área tubular innervada menor que la observada en los machos no copuladores o sin experiencia (Figura 7).

Fibras inmunopositivas para TH se observaron peritubularmente en el segmento distal del epidídimo, región que se conecta con el *Vas deferens* en todos los grupos de ratas. Observaciones cuali-cuantitativas realizadas en los cortes histológicos revelaron que las caudas de los epidídimos correspondientes a los

machos no copuladores tuvieron un mayor número de fibras autonómicas catecolaminérgicas en comparación con las observadas en la misma región en los machos copuladores. Los machos sin experiencia sexual mostraron cantidades intermedias de fibras en relación a los machos no copuladores y copuladores.

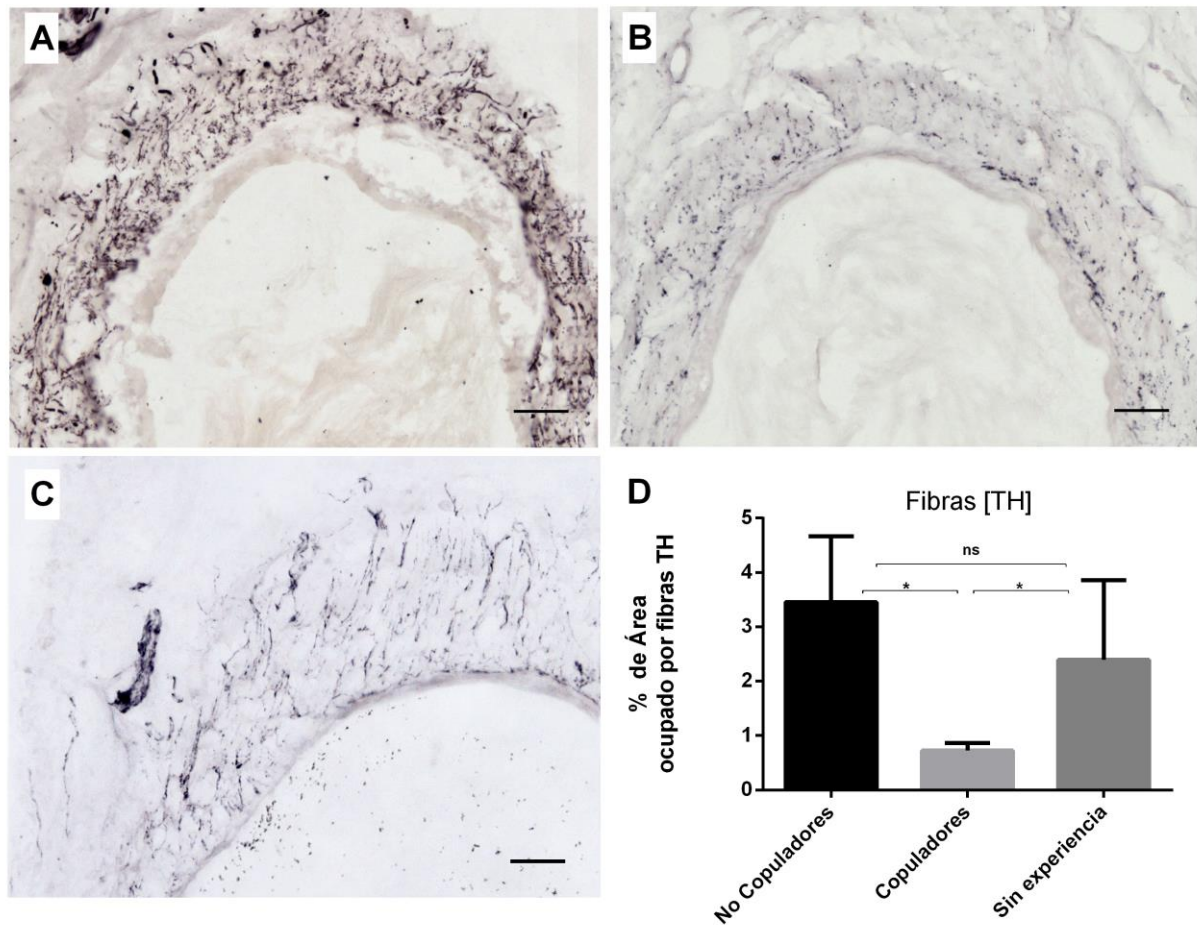


Figura 7. (A) Microfotografías que muestran la distribución peritubular de fibras catecolaminérgicas inmunoreactivas para la enzima tirosina hidroxilasa en la cauda del epidídimo de ratas macho no copuladoras, (B) copuladoras y (C) sin experiencia sexual. El gráfico en D muestra la estimación del porcentaje de área ocupada por fibras autonómicas catecolaminérgicas en la cauda del epidídimo en los tres grupos. Los grupos se compararon mediante la prueba estadística de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunn: * $p < .05$. Escala = 60 μ m.

7.3. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de área inervada en el glándula al ser comparada entre los machos copuladores, no copuladores y sin experiencia (Figura 8).

Fibras autonómicas inmunopositivas para acetilcolín-transferasa se observaron en las regiones intra-trabeculares de los cuerpos cavernosos del pene en todos los grupos de ratas. Observaciones cuali-cuantitativas realizadas en los cortes no mostraron diferencias en el porcentaje de área ocupada por fibras autonómicas colinérgicas entre grupos (Ver Figura 9). Sin embargo, los valores absolutos (la sumatoria total de las micras cuadradas encontradas) de este parámetro si revelan diferencias significativas que favorecen a las ratas machos no copuladoras y a aquellas sin experiencia (Ver Figura 1 complementaria en Anexo).

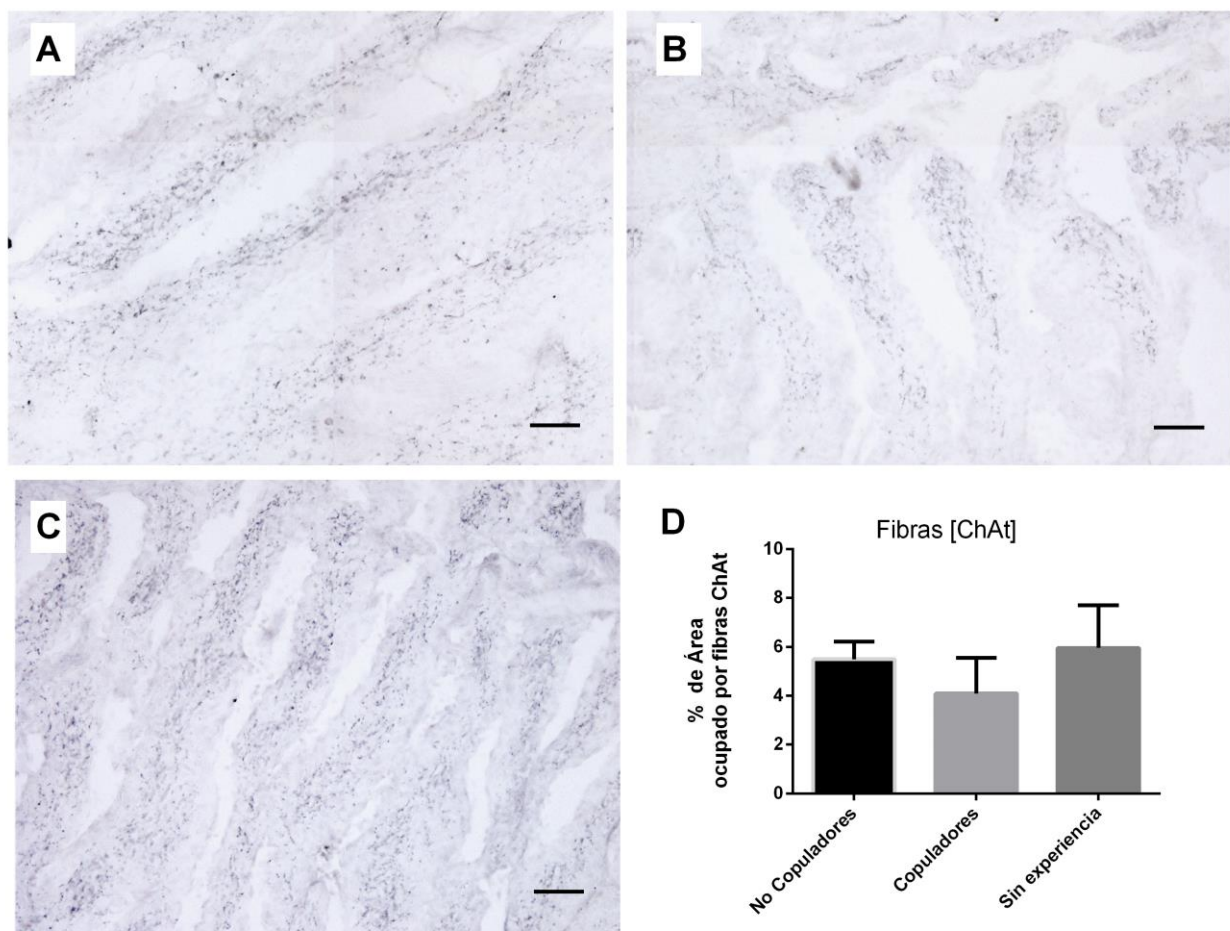


Figura 9. Microfotografías que muestran la distribución intra-trabecular de las fibras autonómicas colinérgicas inmunoreactivas para acetilcolín-transferasa en los cuerpos cavernosos en ratas macho no copuladoras (A), copuladoras (B), o sin experiencia (C). El gráfico en D muestra la estimación del porcentaje de área ocupada por fibras autonómicas colinérgicas ubicadas en glándula en los tres grupos. Escala= 60µm.

Capítulo 8. Discusión

En general, los machos de todas las especies expresan su conducta copulatoria de forma diversa. En la rata macho esta diversidad se ha atribuido a diferencias interindividuales en la disponibilidad de hormonas sexuales y de sus receptores en núcleos hipotalámicos asociados con el sistema vomeronasal-hipotálamo (Portillo et al., 2006; 2007), estudios recientes sugieren que éstas también podrían asociarse con diferencias en la inervación de los genitales. Investigaciones en curso de nuestro laboratorio indican que las ratas macho copuladoras poseen una representación cerebral de los genitales de menor tamaño en comparación con la correspondiente representación en ratas no copuladoras. En concordancia con esta noción, en nuestro trabajo mostramos que inervación catecolaminérgica en la cauda del epidídimo se encuentra disminuida en los machos copuladores al ser comparados con los machos sin experiencia sexual y con aquellos considerados como no copuladores. De esta forma, nuestros datos apoyan la posibilidad de que diferencias en la inervación autonómica catecolaminérgica de los órganos sexuales pudiesen contribuir a explicar la diversidad de la conducta copulatoria observada entre las ratas machos. Es menester comentar, sin embargo, que la inervación colinérgica relativa (aunque si la absoluta) en el glande no difirió significativamente entre los grupos. Por lo tanto, estudios ulteriores tendrán que abordar de forma causal la relación entre las densidad de inervación somática y autonómica en los órganos sexuales de ratas con diferente fenotipo copulatorio.

Un dato interesante es que el porcentaje de área ocupada por inervación autonómica catecolaminérgica en la cauda epidídimal sea mayor en las ratas macho no copuladoras y sin experiencia que en las copuladoras. Estudios previos mostraron que la inervación autonómica catecolaminérgica en esta zona del epidídimo es sujeta a un proceso de remodelación por eliminación axonal entre los días 40 a 120 de vida postnatal en la rata (Silva et al., 2002). La mayor cantidad de fibras observada en los animales no copuladores o sin experiencia sexual sugiere que el proceso de eliminación no tiene lugar es está abatido. Dado que la mayor cantidad de fibras autonómicas catecolaminérgicas en el epidídimo se asocia con el control de la contracción muscular, nuestros datos sugieren que

el proceso de eyaculación en estos grupos de animales debe ser ineficaz. La poli-inervación en el tejido muscular esquelético se asocia con un control inadecuado del movimiento. La eliminación de ésta, ayuda a mejorar el control y la fineza del movimiento voluntario (Purves, 1988). Por lo que una conectividad refinada en las ratas copuladoras puede estar asociada con un mejor proceso de eyaculación.

Otra posible causa que de origen a las diferencias de inervación catecolaminérgica autonómica epidídimal observadas entre animales de distintos fenotipo copulatorio tiene que ver con diferencias en los niveles de hormonas sexuales. Estudios llevados a cabo sobre la inervación del núcleo dimórfico sexual en los años 80s revelaron que la longitud dendrítica y el tamaño del soma de neuronas que inervan la musculatura perineal aumentan cuando los niveles de andrógenos en plasma se incrementan (Forger and Breedlove, 1986; Kurz et al., 1986; Sengelau et al., 1986), en concreto se sabe que andrógenos y sus metabolitos son necesarios para el desarrollo y mantenimiento de este sistema neuromotor aun cuando los machos han sido quirúrgicamente castrados en la adultez (Verhovshek et al., 2010). Por lo tanto estos niveles de hormonas sexuales pudiesen estar afectando la cantidad de inervación recibida a órganos genitales y consecuentemente provocar modificaciones en la representación cortical y variabilidad en la representación cortical de los genitales entre machos.

Una tercera posibilidad que podría explicar las diferencias en la cantidad de fibras autonómicas catecolaminérgicas entre las ratas macho de distinto fenotipo pudiera estar asociada con diferencias en la estimulación temprana de la región anogenital. En apoyo a lo anterior, estudios han relacionado en concreto a la conducta materna como causa primaria de la variabilidad fenotípica copulatoria en ratas (Moore, 1992, Cameron et al., 2005; Champagne, 2003; Lenz & Sengelau, 2006, 2010). Moore (1992) observó que la estimulación directa de las madres a zonas perineales y ano-genitales de sus crías es una actividad que realizan constantemente las primera tres semanas *post-partum*. Esta actividad es mayormente realizada sobre las crías de sexo masculino (Moore, 1979), ya que se encontró que la orina de los machos, así como glándulas ubicadas en el prepucio, del recién nacido contienen factores quimo-atrayentes como el dodecil

propionato que inducen la conducta de estimulación ano-genital por parte de la madre (Moore & Samonte, 1986; Brouette-lahlou, 1991). Esta conducta de estimulación ano-genital contribuye al desarrollo de la conducta sexual masculina y a mecanismos en el sistema nervioso central que controlan reflejos copulatorios. También reportaron que machos criados sin estimulación ano-genital maternal tuvieron latencias eyaculatorias más largas y mayores intervalos inter-intromisión ya que eran menos propensos a realizar montas y patrones intromisivos disminuidos (Moore, 1992). Posteriormente se encontró que la estimulación maternal influye directamente en el desarrollo del núcleo espinal bulvocavernoso (SNB, por sus siglas en ingles), un núcleo dimórfico sexual ubicado en zonas lumbares que controla reflejos peneanos altamente involucrado en la copula. La estimulación ano-genital tiene influencia sobre las motoneuronas en el SNB, reducciones en la estimulación resultan menos motoneuronas y también conlleva a cambios funcionales en la adultez como incrementos en latencia eyaculatoria, incrementos en la intromisión post eyaculatoria y mayores intervalos de intromisivos (Lenz & Sengelaub, 2006). La estimulación ano-genital provoca un incremento en la expresión de *c-fos* en el campo dendrítico del SNB sugiriendo que la estimulación táctil regula el crecimiento dendrítico a través de un mecanismo dependiente de la actividad (Lenz & Sengelaub, 2010), y señalaron que esta vía de señalización es regulada por aferentes oxitocinérgicas del núcleo para ventricular del hipotálamo, en el mismo estudio encontraron que 60 segundos de estimulación eran necesarios para encontrar un incremento del 89% en los niveles de oxitocina en la médula espinal lumbosacra. Todos estos resultados sugieren que la estimulación mediada por la madre en etapas tempranas desencadena un mecanismo de activación en el desarrollo del sistema nervioso y a su vez, funcionan como un potente modulador de la masculinización.

Capítulo 9. Conclusiones.

Este es el primer trabajo que trata de evaluar si ratas macho copuladoras y no copuladoras están distintamente inervados en genitales, epidídimo y glande, específicamente. En conclusión, nuestros datos apoyan el concepto de que algunas diferencias en los patrones de inervación de los órganos genitales pudiesen contribuir a explicar las diferencias del fenotipo copulatorio entre las ratas macho. Esto en asociación a las diferencias observadas a nivel del sistema nervioso central. Futuros estudios deberán evaluar si las diferencias observadas involucran otros órganos y distintos tipos de inervación. Por otra parte, el presente trabajo se situó dentro del contexto teórico de competencia espermática y los modelos econométricos aportados por Parker. Como se mencionó anteriormente, estos modelos buscan encontrar las estrategias evolutivamente estables para la deposición espermática, y aunque consideran la variabilidad fenotípica, no contemplan a fondo el amplio rango de opciones conductuales que pudiesen tomar los machos ante la evaluación de un ambiente socio-sexual competitivo. Por lo tanto es menester integrar esta variabilidad fenotípica copulatoria a los modelos matemáticos propuestos por Parker y colaboradores con el objetivo de ampliar su poder predictivo.

Capítulo 10. Referencias

- Ambriz, D., Rosales, A. M., Sotelo, R., Mora, J. A., Rosado, A., & García, A. R. (2002). Changes in the quality of rabbit semen in 14 consecutive ejaculates obtained every 15 minutes. *Archives of Andrology*, 48(5), 389–395. doi:10.1080/01485010290099255
- Arnqvist, G. (1998). Comparative evidence for the evolution of genitalia by sexual selection. *Nature*, 393(June), 784–786. doi:10.1038/31689
- Allard, J., Truitt, W. A., McKenna, K. E., & Coolen, L. M. (2005). Spinal cord control of ejaculation. *World Journal of Urology*, 23(2), 119–126. doi:10.1007/s00345-004-0494-9
- Baker, R. B., & Bellis, M. A. (1988). “Kamikaze” sperm in mammals? *Animal Behaviour*. 36(9) 936-938. doi:10.1016/S0003-3472(88)80178-7
- Birkhead, T. R. (1998). Sperm competition in birds. *Reviews of Reproduction*, 98(3), 123–129. doi:10.1530/ror.0.0030123
- Blengini, C. S., Sergio, N., Gabriela, C., Giojalas, L. C., & Margarita, C. (2014). Variability in sperm form and function in the context of sperm competition risk in two Tupinambis lizards. *Ecology and Evolution*, 4(21), 4080–4092. doi:10.1002/ece3.1262
- Borgdorff, A. J., Rössler, A. S., Clément, P., Bernabé, J., Alexandre, L., & Giuliano, F. (2009). Differences in the spinal command of ejaculation in rapid ejaculating rats. *Journal of Sexual Medicine*, 6(8), 2197–2205. doi:10.1111/j.1743-6109.2009.01308.x
- Bretman, A., Gage, M. J. G., & Chapman, T. (2011). Quick-change artists: Male plastic behavioural responses to rivals. *Trends in Ecology and Evolution*, 26(9), 467–473. doi:10.1016/j.tree.2011.05.002
- Brouette-lahlou, I., Amouroux, R., Chastrette, F., Cosnier, J., Stoffelsma, J., & Vernet-maury, E. (1991). Dodecyl propionate, attractant from rat pup preputial gland: Characterization and identification. *Journal of Chemical Ecology*, 17(7), 1343–1354. <http://doi.org/10.1007/BF00983767>
- Byrne, P. G., Roberts, J. D., & Simmons, L. W. (2002). Sperm competition selects for increased testes mass in Australian frogs. *Journal of Evolutionary Biology*, 15(3), 347–355. doi:10.1046/j.1420-9101.2002.00409.x
- Cameron, N. M., Champagne, F. a., Parent, C., Fish, E. W., Ozaki-Kuroda, K., & Meaney, M. J. (2005). The programming of individual differences in defensive responses and reproductive strategies in the rat through variations in maternal care. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 29(4-5). 843-865. doi: 10.1016/j.neubiorev.2005.03.022
- Cordero Rivera, A, Andrés, J. A, Córdoba-Aguilar, A., & Utzeri, C. (2004). Postmating sexual selection: allopatric evolution of sperm competition mechanisms and genital morphology in calopterygid damselflies (Insecta: Odonata). *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 58(2), 349–359. doi:10.1111/j.0014-3820.2004.tb01650.x

- Champagne, F. A., Francis, D. D., Mar, A., & Meaney, M. J. (2003). Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiology and Behavior*, 79(3), 359–371. doi:10.1016/S0031-9384(03)00149-5
- Craig, W. (1921). Why Do Animals Fight? *Ethics*, 31(3), 264-278. doi:10.1086/207292
- DelBarco-Trillo, J., & Ferkin, M. H. (2007). Increased sperm numbers in the vas deferens of meadow voles, *Microtus pennsylvanicus*, in response to odors of conspecific males. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 61(11), 1759–1764. doi:10.1007/s00265-007-0408-0
- Dewsbury, D. A. (1982). Ejaculate Cost and Male Choice. *The American Naturalist*, 119(119), 601-610. doi:10.1086/283938
- Dixson, A.F. (1995b). Sexual selection and ejaculatory frequencies in primates. *Folia Primatology*, 64(3), 146-152. doi:10.1159/000156845
- Elbert, T., Pantev, C., Wienbruch, C., Rockstroh, B., & Taub, E. (1995). Increased cortical representation of the fingers of the left hand in string players. *Science (New York, N.Y.)*, 270(5234), 305–307. doi:10.1126/science.270.5234.305
- Emlen, S. T., & Oring, L. W. (1977). Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems. *Science*, 197(4300), 215–223.
- Esquivel-Franco, D. (2014). *Mapeo de la representación cortical de los genitales en la rata macho*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Psicología. UNAM. México.
- Fetter-Pruneda, I., Geovannini-Acuña, H., Santiago, C., Ibarrarán-Viniegra, A. S., Martínez-Martínez, E., Sandoval-Velasco, & Gutiérrez-Ospina, G. (2013). Shifts in developmental timing, and not increased levels of experience-dependent neuronal activity, promote barrel expansion in the primary somatosensory cortex of rats enucleated at birth. *PLoS One*, 8(1), e54940. doi:10.1371/journal.pone.0054940
- Forger, N. G., & Breedlove, S. M. (1986). Sexual dimorphism in human and canine spinal cord: role of early androgen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(19), 7527–7531. doi: 10.1073/pnas.83.19.7527
- Fuentes-Morales, M. R. (2013). *Aportaciones al Modelo Teórico de Competencia Espermática: Evidencias en la Rata de Laboratorio*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala. Tlaxcala.
- Georgiadis, J. R. (2012). Doing it ... wild? On the role of the cerebral cortex in human sexual activity. *Socioaffective Neuroscience & Psychology*, 2(0), 17337. doi:10.3402/snp.v2i0.17337
- Gomendio M., Harcourt, A. H. & Roldán, E., R. S. 1998. Sperm competition in mammals. En Birkhead T. R. & Moller A. P. (Eds.): Sperm competition and sexual selection. Academic Press, San Diego. pp. 667-751.
- Gutiérrez-García, a. G., & Contreras, C. M. (2002). Algunos aspectos etológicos de la comunicación química en ratas y ratones de laboratorio. *Revista Biomédica*, 13(3), 189–209. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2002/bio023f.pdf>

- Hyde, K. L., Lerch, J., Norton, A., Forgeard, M., Winner, E., Evans, A. C., & Schlaug, G. (2009). The effects of musical training on structural brain development: A longitudinal study. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1169(1), 182–186. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04852.x
- Hosken, D. J., & Stockley, P. (2004). Sexual selection and genital evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(2), 87–93. doi:10.1016/j.tree.2003.11.012
- Immler, S., Moore, H. D. M., Breed, W. G., & Birkhead, T. R. (2007). By hook or by crook? Morphometry, competition and cooperation in rodent sperm. *PLoS ONE*, 2(1), e170. doi:10.1371/journal.pone.0000170
- Jennions, M. D., & Petrie, M. (2000). Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. *Biological Reviews*, 75(1), 21–64. Doi:10.1111/j.1469-185X.1999.tb00040.x
- Jones, R. C., Dacheux, J. L., Nixon, B., & Ecroyd, H. W. (2007). Role of the epididymis in sperm competition. *Asian Journal of Andrology*, 9(4), 493–499. doi:10.1111/j.1745-7262.2007.00284.x
- Kurz, E.M., Sengelaub, D.R., Arnold, A. P. (1986) Androgens regulate the dendritic length of mammalian motoneurons in adulthood. *Science*, 232(4748), 395-398. Doi:10.1126/science.3961488
- Lenz, K. M., & Sengelaub, D. R. (2006). Maternal licking influences dendritic development of motoneurons in a sexually dimorphic neuromuscular system. *Brain Research*, 1092(1), 87–99. Doi:10.1016/j.brainres.2006.03.070
- Lenz, K. M., & Sengelaub, D. R. (2010). Maternal care effects on the development of a sexually dimorphic motor system: The role of spinal oxytocin. *Hormones and Behavior*, 58(4), 575–581. doi:10.1016/j.yhbeh.2010.07.010
- Lucio, R. & Tlachi, J. (2008). Análisis de la copula y el eyaculado en la rata albino. (Rattus norvegicus). Manual de Laboratorio. Góngora Ediciones. Tlaxcala, México.
- Lukas, D. (2013). Caring for Offspring in a World of Cheats. *PLoS Biology*, 11(3), e1001519. doi:10.1371/journal.pbio.1001519
- Martínez, I., & Paredes, R. G. (2001). Only self-paced mating is rewarding in rats of both sexes. *Hormones and Behavior*, 40(4), 510–517. doi:10.1006/hbeh.2001.1712
- Moller, A. P. (1987). Mate guarding in the swallow *Hirundo rustica*: An experimental study. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 21(2), 119–123. doi: 10.1007/BF02395439
- Moore, H., Dvorakova, K., Jenkins, N., & Breed, W. (2002). Exceptional sperm cooperation in the wood mouse. *Nature*, 418(6894), 174–177. Retrieved from doi:10.1038/nature00832
- Moore, C. L. & B. Samonte. (1986). Preputial glands of infant rats (*Rattus norvegicus*) provide chemosignals for maternal discrimination of sex. *Journal of Comparative Psychology*, 100(1), 76-80. Doi: 10.1037/0735-7036.100.1.76

- Moore, C. (1992). The role of maternal stimulation in the development of sexual behaviour and its neural basis. *Annals New York Academy of Science*, 662(1), 160-177.
- Moore, C. L., & Morelli, G. A. (1979). Mother rats interact differently with male and female offspring. *Journal of Comparative & Physiological Psychology*, 93(4), 677–684. doi: 10.1037/h0077599
- Olsson, M. (2001). “Voyeurism” prolongs copulation in the dragon lizard *Ctenophorus fordi*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 50(2001), 378–381. doi:10.1007/s002650100373
- Parker, G.A. (1970). Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biology Review*. 45(4), 525–567. doi: 10.1111/j.1469-185X.1970.tb01176.x
- Parker, G. A. (1982). Why are there so many tiny sperm? Sperm competition and the maintenance of two sexes. *Journal of Theoretical Biology*, 96(2), 281–294. doi:10.1016/0022-5193(82)90225-9
- Parker, G. A. (1984). Sperm competition and the evolution of animal mating strategies. *Sperm competition and the evolution of animal mating systems*, 1-60.
- Parker, G., & Maynard Smith, J. (1990). Optimality theory in evolutionary biology. *Nature*, 348, 27–33.
- Parker, G. a, & Begon, M. E. (1993). Sperm competition games: sperm size and number under gametic control. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 253(1338), 255–262. doi:10.1098/rspb.1993.0111
- Parker, G. A., Ball, M. A., Stockley, P., & Gage, M. J. (1997). Sperm competition games: a prospective analysis of risk assessment. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 264(1), 1793–1802. doi:10.1098/rspb.1997.0249
- Parker, G. A, & Ball, M. A. (2005). Sperm competition, mating rate and the evolution of testis and ejaculate sizes: a population model. *Biology Letters*, 1(2), 235–238. doi:10.1098/rsbl.2004.0273
- Pattij, T., De Jong, T. R., Uitterdijk, A., Waldinger, M. D., Veening, J. G., Cools, A. R., ... Olivier, B. (2005). Individual differences in male rat ejaculatory behaviour: Searching for models to study ejaculation disorders. *European Journal of Neuroscience*, 22(4), 724–734. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04252.x
- Penfield, W. & Rasmussen, T. (1950). *The cerebral cortex of the man*. New York: Macmillan Company.
- Pichardo-Cruz, A. I. (2015). *Diversidad fenotípica eyaculatoria en la rata macho: implicaciones para el modelo de la competencia espermática*. Tesis de Doctorado en Ciencias de la Producción y Salud Animal. UNAM. México.
- Portillo, W., Castillo, C. G., Retana-Márquez, S., Roselli, C. E., & Paredes, R. G. (2007). Neuronal activity of aromatase enzyme in non-copulating male rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 19(2), 139–141. doi:10.1111/j.1365-2826.2006.01513.x

- Portillo, W., Díaz, N. F., Cabrera, E. A., Fernández-Guasti, A., & Paredes, R. G. (2006). Comparative analysis of immunoreactive cells for androgen receptors and oestrogen receptor α in copulating and non-copulating male rats. *Journal of Neuroendocrinology*, *18*(3), 168–176. doi:10.1111/j.1365-2826.2005.01401.x
- Pound, N., & Gage, M. J. G. (2004). Prudent sperm allocation in Norway rats, *Rattus norvegicus*: A mammalian model of adaptive ejaculate adjustment. *Animal Behaviour*, *68*(4), 819–823. doi:10.1016/j.anbehav.2004.02.004
- Pouchelon, G., & Jabaudon, D. (2014). Nurturing the cortex's thalamic nature. *Current Opinion in Neurology*, *27*(2), 142–8. doi:10.1097/WCO.0000000000000070
- Preston, B. T., Stevenson, I. R., Pemberton, J. M., & Wilson, K. (2001). Dominant rams lose out by sperm depletion. *Nature*, *409*(2), 681–682. doi:10.1038/35055617
- Preston, B. T., & Stockley, P. (2006). The prospect of sexual competition stimulates premature and repeated ejaculation in a mammal. *Current Biology*, *16*(7), 239-241.
- Purves, D., Riddle, D. R., White, L. E., & Gutierrez-Ospina, G. (1994). Neural activity and the development of the somatic sensory system. *Current Opinion in Neurobiology*, *4*(1), 120–123. doi:10.1016/0959-4388(94)90041-8
- Purves D. (1988). *Body and Brain: A Trophic Theory of neural connections*. 1st edition. Cambridge, Massachusetts and London, England: Harvard University Press.
- Ramm, S. A., & Stockley, P. (2007). Ejaculate allocation under varying sperm competition risk in the house mouse, *Mus musculus domesticus*. *Behavioral Ecology*, *18*(2), 491–495. doi:10.1093/beheco/arm003
- Rasotto, M. B., & Shapiro, D. Y. (1998). Morphology of gonoducts and male genital papilla, in the bluehead wrasse: implications and correlates on the control of gamete release. *J. Fish Biol.*, *52*(4), 716–725. doi:10.1111/j.1095-8649.1998.tb00815.x
- Rudolfson, G., Figenschou, L., Folstad, I., Tveiten, H., & Figenschou, M. (2006). Rapid adjustments of sperm characteristics in relation to social status. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, *273*(1584), 325–332. doi:10.1098/rspb.2005.3305
- Sachs, B.D. & Meisel, R.L. (2006). The physiology of male sexual behavior. In: Knobil E. and Neill, J.D. (eds.). *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York. 1393-1485.
- Silva, A. M., Queiróz, D. B. C., Castro Neto, E. F., Naffah-Mazzacoratti, M. D. G., Godinho, R. O., Porto, C. S.,... Avellar, M. C. W. (2002). Segment-specific decrease of both catecholamine concentration and acetylcholinesterase activity are accompanied by nerve refinement in the rat cauda epididymis during sexual maturation. *Journal of Andrology*, *23*(3), 374–383.
- Shalender-Bhasin, S.; Benson, G.S. (2006) Male Sexual Function. In: Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*, Sixth Edition, 1186-1194.
- Setchell, B. P.; Breed W. G. (2006) Anatomy, Vasculature, and Innervation of the Male Reproductive Tract. Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*, Third Edition. 803 -807.

- Short, R.V. (1979). Sexual selection and its component parts, somatic and genital selection, as illustrated by man and the great apes. *Advances in the study of Behavior*, 9(1), 131-158.
- Sengelaub, D. R., & Arnold, A. P. (1986). Development and loss of early projections in a sexually dimorphic rat spinal nucleus. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 6(6), 1613–1620.
- Seney, M. L., Kelly, D. A., Goldman, B. D., Šumbera, R., & Forger, N. G. (2009). Social structure predicts genital morphology in African mole-rats. *PLoS ONE*, 4(10), e7477. doi:10.1371/journal.pone.0007477
- Snow, L. S. E., Abdel-Mesih, A., & Andrade, M. C. B. (2006). Broken copulatory organs are low-cost adaptations to sperm competition in redback spiders. *Ethology*, 112(4), 379–389. doi:10.1111/j.1439-0310.2006.01163.x
- Steers, W. D. (2000). Neural pathways and central sites involved in penile erection: Neuroanatomy and clinical implications. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24(5), 507–516. doi:10.1016/S0149-7634(00)00019-1
- Stockley, P., & Preston, B. T. (2004). Sperm competition and diversity in rodent copulatory behaviour. *Journal of Evolutionary Biology*, 17(5), 1048–1057. doi:10.1111/j.1420-9101.2004.00742.x
- Truitt, W. A., & Coolen, L. M. (2002). Identification of a potential ejaculation generator in the spinal cord. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5586), 1566–1569. doi:10.1126/science.1073885
- Verhovshek, T., Buckley, K. E., Sargent, M. A., & Sengelaub, D. R. (2010). Testosterone metabolites differentially maintain adult morphology in a sexually dimorphic neuromuscular system. *Developmental Neurobiology*, 70(4), 206–221. http://doi.org/10.1002/dneu.20780
- Vosshall, L. B. (2005). Social signals: The secret language of mice. *Current Biology*, 15(7), 257-259. doi:10.1016/j.cub.2005.03.027
- Woosley, T.A., Van Der Loos, H. 1970. The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex: The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Research*, 17(2), 205-242. doi:10.1016/0006-8993(70)90079-X
- Wigby, S., & Chapman, T. (2004). Sperm competition. *Current Biology*, 14(3), R100-R103. doi:10.1016/j.cub.2004.01.013
- Zajonc, R. B. (1965). Social Facilitation. *Science*, 149(3681), 269-274. doi: 10.1126/science.149.3681.269doi:10.1126/science.149.3681.269

Anexo 1

Figuras complementarias.

Los datos obtenidos a través de la cuantificación de fibras nerviosas inmunopositivas para tirosina hidroxilasa (TH) en epidídimo y acetil-colín transferasa (ChAt) en glande fueron analizados sin ser convertidos en el porcentaje de área ocupada con relación al tamaño total de área de la fotografía ($308,325 \mu^2$). A estos datos crudos se les corrió la prueba Saphiro-Wilk para contrastar la normalidad de los mismos. Posteriormente, ya cuando se validó que los datos vienen de una distribución normal fueron analizados mediante una ANOVA de una vía y una prueba *Post-Hoc* de Tukey. Los resultados arrojados muestran un mayor número de área TH inmunopositiva epidídimal de los machos no copuladores que en los machos sin experiencia y los machos no copuladores. De igual forma se encontraron diferencias significativas con respecto al área inmunopositiva para fibras colinérgicas del glande entre machos no copuladores y machos copuladores.

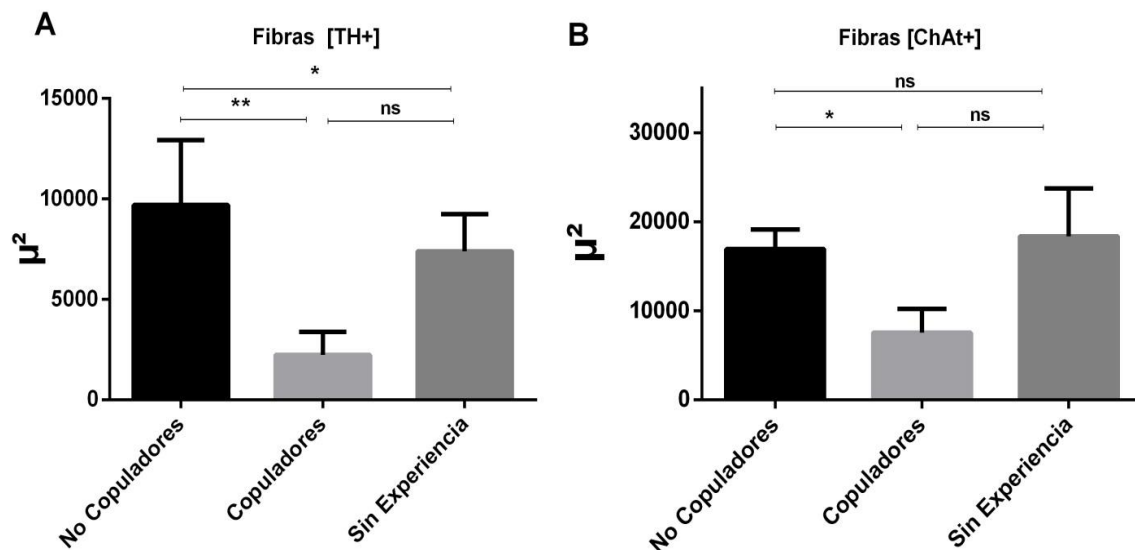


Figura 10. Gráficas que muestran la sumatoria total del área de inervación inmunopositiva en las dos estructuras evaluadas. (A) Cuantificación del área total inmunopositiva para tirosina hidroxilasa (TH) en cauda epidídimal y (B) cuantificación del área total inmunopositiva para acetil-colín transferasa (ChAt) en glande entre ratas macho de distinto fenotipo copulatorio. Datos representados como media \pm D.E. ANOVA, * $p < .05$, ** $p < 0.01$.