



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

Y

UNIVERSITY OF GRONINGEN
GRADUATE SCHOOL OF SCIENCES
GRONINGEN INSTITUTE FOR EVOLUTIONARY LIFE SCIENCES

EN BUSCA DE
MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LA DISFUNCIÓN SEXUAL
MASCULINA: ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS EN RATAS NORMALES Y
NOQUEADAS DEL TRANSPORTADOR DE SEROTONINA.

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

PRESENTA:
DIANA CAROLINA ESQUIVEL FRANCO

DIRECTORES DE TESIS
GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
JOCELIEN D.A. OLIVIER
GRONINGEN INSTITUTE FOR EVOLUTIONARY LIFE SCIENCES

COMITÉ TUTOR
JOSÉ ALONSO FERNÁNDEZ GUAISTI
DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA
CINVESTAV
DRA. MARGARITA MARTÍNEZ GÓMEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO 2020



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.



university of
 groningen



In search of animal models for male sexual dysfunction

Pharmacological studies in normal and serotonin transporter
knockout rats

PhD thesis

to obtain the degree of PhD at the
University of Groningen
on the authority of the
Rector Magnificus Prof. C. Wijmenga
and in accordance with
the decision by the College of Deans

and

to obtain the degree of PhD at the
Universidad Nacional Autónoma de México
on the authority of the
Rector Magnificus Prof. E. Graue
and in accordance with
the decision by the College of Deans.

Double PhD degree

This thesis was defended in public on

Friday 20 September 2019 at 14.30 hours

by

Diana Carolina Esquivel Franco

born on 28 August 1987
in Mexico City, Mexico

Supervisors

Prof. J.D.A. Olivier

Prof. M.J.H. Kas

Prof. G. Gutierrez Ospina

Assessment Committee

Prof. J.C. Billeter

Prof. A.J.W. Scheurink

Prof. L.J.M.J. Vanderschuren

Prof. G. Roldan Roldan

El proyecto presentado en esta tesis fue una colaboración entre la Universidad de Groningen (RUG), Países Bajos y la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México. La investigación se realizó en el grupo de neurobiología del comportamiento en el Instituto de Ciencias de la Vida Evolutiva de Groninga (GELIFES, RUG) y en el Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB-UNAM). El estudio fue apoyado por una beca de la RUG y una beca CONACyT número 191062, México.



Tabla de contenidos

Resumen en español	6
English Summary	15
Nederlandse samenvatting.....	23
Capítulo 1 Introducción.....	32
Capítulo 2 ¿La latencia de la eyaculación está relacionada con el tamaño de la representación cortical genital?	63
Capítulo 3 Comportamiento sexual en ratas macho noqueadas al transportador de serotonina	84
Capítulo 4 Tramadol: los efectos sobre el comportamiento sexual en ratas macho son causados principalmente por sus efectos de bloqueo de la recaptación de 5-HT.....	104
Capítulo 5 Efectos inhibitorios del tramadol sobre el comportamiento sexual: estudios farmacológicos en ratas noqueadas del transportador de serotonina	127
Capítulo 6 Estudios farmacológicos sobre el papel de los receptores 5-HT _{1A} en el comportamiento sexual masculino de ratas normales y noqueadas del transportador de serotonina.	166
Capítulo 7 Discusión General	204
Referencias	222

Resumen en español

Capítulo 1

Antecedentes

La función sexual masculina ha sido un tema de interés para la comunidad científica durante las últimas décadas. Se ha prestado especial atención a las disfunciones como la eyaculación precoz (EP) y la eyaculación retardada (ER), que afectan a una parte considerable (20-30%) de la población mundial masculina. Aunque estas condiciones no ponen en peligro la vida, pueden afectar significativamente las relaciones de quienes las padecen tanto emocional como interpersonalmente. En general, un factor importante para el diagnóstico de estas disfunciones es que generalmente conducen a la insatisfacción sexual de la pareja y tienen un impacto muy negativo en ella. Los orígenes de las disfunciones sexuales son motivo de controversia, ya que pueden ser el resultado de varios factores psicosociales, biológicos y genéticos que pueden condicionar emocionalmente a una persona para que tenga niveles elevados de ansiedad antes o durante el encuentro sexual, lo que resulta en un desempeño sin éxito. Uno de los principales efectos secundarios de los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS), que son el tratamiento de primera línea para la depresión mayor, es un retraso en la eyaculación. Por lo tanto, los ISRS se usan como tratamiento para la eyaculación precoz. Aunque estos medicamentos pueden mejorar el rendimiento sexual de un cierto porcentaje (45-65%) de hombres con EP, una gran cantidad de ellos recaen con el uso crónico y a largo plazo de estos medicamentos para el tratamiento de la EP, y pueden afectar adversamente el comportamiento sexual y la eyaculación, causando una disfunción sexual crónica por ISRS.

Por otro lado, la eyaculación retardada (ER) es una disfunción sexual que, aunque es menos frecuente que la EP, afecta a un 15% de los individuos y, hasta ahora, su etiología y mecanismos no son bien conocidos. Al receptor 5-HT_{1A} se le ha atribuido un papel importante en el

comportamiento sexual masculino, ya que la estimulación de este receptor por varios agonistas 5-HT_{1A} induce efectos pro sexuales en ratas. Los agonistas del receptor 5-HT_{1A} como el 8-OH-DPAT, entre otros, han demostrado disminuir la latencia de la primera eyaculación y disminuir el número de montas e intromisiones para eyacular en ratas. Estos agonistas del receptor 5-HT_{1A} no están permitidos para uso humano, lo que significa que estamos en busca de un nuevo agonista del receptor 5-HT_{1A} para tratar la ER. El efecto pro sexual en el comportamiento sexual causado por los agonistas del receptor 5-HT_{1A} puede ser bloqueado por los antagonistas del receptor 5-HT_{1A} (por ejemplo, WAY100,635), que por sí solos no tienen actividad intrínseca. En condiciones basales, los receptores 5-HT_{1A} pueden no desempeñar un papel crucial en el comportamiento sexual, pero se vuelven relevantes cuando son activados por los agonistas del receptor 5-HT_{1A} o en condiciones de altos niveles de serotonina (5-HT) extracelular, por ejemplo, los inducidos por los ISRS.

La falta de efectividad de los tratamientos disponibles actuales para los trastornos sexuales indica que los modelos farmacológicos, psicosociales y etiológicos disponibles en este momento no son suficientes para comprender la disfunción sexual.

Pregunta de investigación

El objetivo general de esta tesis fue investigar los mecanismos implicados en la expresión de la disfunción sexual eyaculatoria. Específicamente: 1) se evaluó el papel de la corteza somatosensorial en la expresión del comportamiento copulatorio. 2) se estudió el papel del transportador de serotonina (SERT) en el desempeño sexual utilizando la rata noqueada del SERT. Un modelo genético animal que se asemeja a una disfunción sexual crónica en humanos inducida por ISRS. 3) se estudió el efecto de la administración aguda de tramadol (un agonista del receptor de opioides μ y ISRS / IRN - inhibidor de la recaptura de norepinefrina, usado más comúnmente como analgésico) en ratas de tipo salvaje (wild-type) de la cepa Wistar SERT^{+/+} y

en ratas SERT^{+/-} y SERT^{-/-}. Por último, 4) se evaluó la función pre y post sináptica de los agonistas preferenciales del receptor 5-HT_{1A} en la expresión de la función sexual.

Modelos animales de disfunción sexual.

La elección de modelos animales se vuelve crítica cuando se traduce el conocimiento científico de la condición humana. La mayor parte de la comprensión actual sobre la función sexual y la función eyaculatoria es el resultado de numerosos estudios en modelos animales, en particular en la especie de *Rattus Norvegicus Albinus*. La función sexual, más particularmente la latencia de la eyaculación, ha sido ampliamente estudiada por grupos de investigación que desarrollaron un modelo conductual en la rata para estudiar la eyaculación precoz y tardía. Esta especie no solo es la mejor entendida en cuanto a su fisiología sexual y reproductiva, sino que las ratas macho también muestran variabilidad en su rendimiento sexual una vez que se estabiliza (después de 4 a 6 sesiones de entrenamiento), especialmente en diferentes fenotipos copuladores, incluidas las variantes según el número de eyaculaciones. El modelo de rata de eliminación de transportador de serotonina (SERT^{-/-}) se ha caracterizado previamente y se han descrito las consecuencias funcionales en las perturbaciones del sistema serotoninérgico en paradigmas de comportamiento. Los animales SERT^{-/-} tienen una exposición "natural" crónica a niveles extremadamente altos de serotonina extracelular en el cerebro, lo que hace que estos animales sean un buen candidato para un modelo que simule la administración crónica de ISRS en humanos. El modelo de rata SERT^{-/-} también puede ser útil para probar nuevos fármacos antidepresivos que poseen propiedades de ISRS y objetivos serotoninérgicos adicionales, para comprender sus efectos y mecanismos de acción más allá de las propiedades de ISRS en el comportamiento sexual.

Capítulo 2

El primer conjunto de experimentos (**capítulo 2**) se dedicó a encontrar posibles nuevas estructuras cerebrales relacionadas con la expresión de la función sexual. Demostramos que la representación anatómica y funcional de los órganos genitales externos en la corteza somatosensorial primaria (S1) de la rata macho varían de acuerdo con la latencia de eyaculación en ratas macho. Los animales considerados eyaculadores normales y rápidos tienen representaciones corticales más grandes de los genitales en S1, que aquellos considerados eyaculadores lentos, no eyaculadores o no copuladores (eyaculadores lentos son aquellos animales cuya latencia de eyaculación es en promedio 1600s, no eyaculadores son aquellos animales que despliegan todos los patrones motores de copula pero no eyaculan y los no copuladores son aquellos machos que no despliegan ninguna conducta copulatoria durante las series de entrenamientos). Estos resultados apoyan la idea de que las diferencias en la expresión del comportamiento copulatorio también están reguladas por diferencias morfo-funcionales en las vías sensoriales. La expresión del comportamiento sexual no solo depende de las acciones tradicionalmente estudiadas de las estructuras neuronales involucradas en la motivación y la implementación del comportamiento sexual y reproductivo, sino que también depende de las contribuciones de las estructuras neuronales responsables del procesamiento de la información sensorial. Por lo tanto, es importante incorporar este concepto para comprender las diferencias en la expresión de la función sexual.

Capítulo 3

Debido a que es de gran importancia contar con modelos animales adecuados para el estudio del comportamiento sexual y los mecanismos relacionados con él, en el **capítulo 3**, recopilamos todos los datos de comportamiento sexual basales producidos durante las sesiones de entrenamiento de nuestro trabajo experimental para esta tesis. Probamos un gran número de ratas modificadas genéticamente al transportador de serotonina (SERT) y los comparamos con

ratas de tipo silvestre. Aunque se ha reportado que los animales SERT^{-/-} tienen un rendimiento sexual distinto (menor) al de SERT^{+/+} o SERT^{+/-}, en este trabajo describimos con mayor detalle las diferencias en el rendimiento sexual de los animales heterocigotos (SERT^{+/-}) u homocigotos (SERT^{-/-}) carentes de SERT. Demostramos que la diferencia en la función sexual entre los animales SERT^{+/+} y los SERT^{-/-} es detectable a partir de la segunda semana (de entrenamiento en comportamiento sexual), en ratas macho entrenadas sexualmente. Las ratas SERT^{-/-} mostraron un número reducido de eyaculaciones en comparación con las ratas SERT^{+/-} y SERT^{+/+}. Aunque anteriormente se demostró que, a nivel molecular y neuroquímico, estos animales modificados genéticamente (tanto SERT^{+/-} como SERT^{-/-}) son diferentes de las ratas SERT^{+/+}, todos nuestros resultados no muestran diferencias entre las ratas SERT^{+/-} (50% de disponibilidad de los transportadores) y SERT^{+/+} ratas. Esto sugiere que no existe una relación lineal entre la cantidad de SERT y el nivel de conducta sexual masculina, al parecer, el 50% de los transportadores todavía es suficiente para realizar una conducta sexual de tipo salvaje. Por lo tanto, utilizamos la rata SERT^{-/-} como modelo animal para la mayoría de nuestros experimentos farmacológicos y los comparamos con animales de tipo salvaje que muestran una función sexual basal normal. Además, buscamos nuevas terapias farmacológicas contra la eyaculación precoz y utilizamos animales con un transportador de serotonina modificado genéticamente, para obtener una mayor comprensión de los posibles mecanismos de acción de estos fármacos.

Capítulo 4

Como se mencionó anteriormente, los tratamientos más exitosos para la EP son los ISRS que bloquean el SERT, lo que influye en los niveles extracelulares de 5-HT que actúan sobre varios receptores de serotonina. El tratamiento con ISRS para la EP requiere la administración crónica y se asocia con efectos secundarios no deseados como náusea, dolor de cabeza, insomnio, fatiga, sensación de boca seca, mareos, impotencia y aneyaculación entre otros. Además, a excepción

de la dapoxetina, los ISRS se prescriben sin ser medicamentos específicamente diseñados para tratar la EP lo que en realidad es una situación no deseada. Por lo tanto, la búsqueda de tratamientos agudos ha cobrado gran importancia. En el **capítulo 4**, probamos los efectos del tramadol (un agonista del receptor de opioides μ y ISRS / IRN- inhibidor de la recaptura de norepinefrina, usado más comúnmente como analgésico) en animales wildtype, como un tratamiento agudo a demanda de la eyaculación precoz. Encontramos que, en altas dosis, el tramadol puede inhibir de forma intensa y aguda el comportamiento sexual. Cuando lo combinamos con naloxona (un antagonista del receptor opioide μ), este tuvo algunos efectos antagonistas menores pero significativos en el número de eyaculaciones e intromisiones y las latencias de eyaculación, monta e intromisión sobre los efectos inhibidores de la dosis más alta de tramadol. Estos datos sugieren que el receptor opioide μ podría jugar un papel en la inhibición de la conducta sexual causada por el tramadol, y que los efectos inhibitorios restantes podrían deberse a efectos de ISRS más fuertes en la dosis más alta (dosis: salina, 10, 20, 40 ó 50 mg/kg). A pesar de que pudimos establecer que su mecanismo de acción prevalente para corregir la disfunción sexual se debe principalmente a las propiedades de los ISRS, los datos recopilados en este estudio sugieren que el componente opioide μ en tramadol podría estar contribuyendo a su efecto inhibitorio sobre la conducta sexual. Por lo tanto, probar el tramadol sobre el comportamiento sexual en ratas noqueadas a SERT nos ayudaría a determinar si la actividad agonista opioide en tramadol ejerce efectos inhibitorios sexuales en ausencia de los efectos inhibidores de SERT del tramadol.

Capítulo 5

En el **capítulo 5**, realizamos un conjunto de experimentos en ratas noqueadas del SERT que confirmaron que el efecto principal agudo del tramadol sobre la función sexual está relacionado con sus propiedades como ISRS y muy poco o nada con su agonista receptor de opioides μ o incluso con sus propiedades antagónicas al transportador de norepinefrina. Este experimento

fue diseñado para ayudarnos a determinar si la actividad agonista de los opioides en el tramadol ejerce efectos inhibidores sexuales en ausencia de SERT, una característica que aporta el modelo de la rata SERT^{-/-}. Probamos este fármaco en ratas SERT^{+/+}, SERT^{+/-} y SERT^{-/-}. Al igual que en el capítulo 4, encontramos que las altas dosis de tramadol tienen un efecto inhibitorio agudo sobre el comportamiento sexual. Sin embargo, la disminución de la función sexual estuvo presente en los tres genotipos. Administramos naloxona (como en el capítulo 4) y WAY100,635 (un antagonista del receptor 5-HT_{1A}) para antagonizar la propiedad antagonista del receptor opioide μ del compuesto y para bloquear la actividad del receptor 5-HT_{1A}, respectivamente. Cuando se administró una dosis intermedia de tramadol junto con WAY100,625, se inhibió la función sexual (como se esperaba cuando se vincula un ISRS y un antagonista del receptor 5-HT_{1A}). Cuando se combinó con naloxona, no fue posible contrarrestar completamente los efectos inhibidores del tramadol en todos los genotipos. El hecho de que, incluso usando animales sin SERT, tramadol puede inducir su efecto inhibitorio sobre el comportamiento sexual y que la naloxona no sea capaz de antagonizarlo completamente, sugiere que la sensibilidad del sistema μ -opioide en el cerebro de las ratas SERT^{-/-} no es diferente debido a la ausencia de SERT y que existen otras propiedades del tramadol que tienen una contribución más importante a sus efectos inhibidores sobre las actividades sexuales masculinas que el sistema opioide.

Capítulo 6

Durante nuestros estudios, el papel de los receptores 5-HT_{1A} en la regulación de la conducta sexual masculina ha sido un tema de interés, ya que su estimulación al administrar sus agonistas, posee efectos pro sexuales en ratas. En el **capítulo 6**, investigamos el papel de los receptores 5-HT_{1A} mediante el uso de dos agonistas preferenciales de dichos receptores, en los animales SERT^{+/+} y SERT^{-/-} (un agonista preferencial se refiere a la capacidad de un receptor para activar diferencialmente las vías de señalización dependiendo de la unión de un agonista preferencial

o “sesgado” en comparación con un agonista "equilibrado", es un paradigma bien establecido para la señalización del receptor acoplado a proteínas G (GPCR)). La estimulación del receptor 5-HT_{1A} mejora la actividad sexual, y en este capítulo, nos enfocamos en los animales que durante sus sesiones de entrenamiento realizaron un nivel sexual relativamente bajo, de modo que pudiéramos evaluar si los fármacos de selección tenían un efecto pro-sexual. Posteriormente utilizamos dos agonistas preferenciales del receptor 5-HT_{1A}, F13714: agonista del receptor 5-HT_{1A} selectivo del autorreceptor y F15599: agonista del receptor 5-HT_{1A} selectivo del hetero-receptor, y los probamos en ratas SERT^{+/+} y SERT^{-/-}. Ambos compuestos indujeron actividad pro sexual en ratas SERT^{+/+} y SERT^{-/-}, pero para F13714 la curva de respuesta a la dosis para el efecto pro sexual en ratas SERT^{-/-} se desplazó hacia la derecha en comparación con SERT^{+/+} ratas, lo que significa que el autorreceptor 5-HT_{1A} es menos sensible en las ratas SERT^{-/-}. Hasta el momento, no hay estudios que evalúen las contribuciones selectivas de los autorreceptores o heterorreceptores 5-HT_{1A}. Un tercer compuesto evaluado fue S15535, un agonista del receptor 5-HT_{1A} selectivo del autorreceptor y antagonista del receptor 5-HT_{1A} selectivo del heterorreceptor, que no tuvo ningún efecto sobre el comportamiento sexual masculino de las ratas SERT^{+/+} y SERT^{-/-}, concluyendo que este compuesto en particular se comporta principalmente como un ligando del receptor 5-HT_{1A} 'silencioso' en el comportamiento sexual de ratas macho. Desafortunadamente, estos estudios no han aportado nueva evidencia de mecanismos pre- o postsinápticos en los efectos pro sexuales de los agonistas del receptor 5-HT_{1A}.

Conclusiones

Finalmente, en el **capítulo 7**, todos nuestros hallazgos (del capítulo 2 al 6) se resumen y discuten con mayor detalle, reconociendo la importancia de los tratamientos farmacológicos para mejorar el control de la eyaculación.

En conclusión, encontramos que hay una representación anatómica y funcional de los órganos genitales externos en la corteza somatosensorial primaria (S1) de la rata macho. El área activada en el S1 por estimulación de los genitales externos se correlaciona con la latencia de la eyaculación. Por lo tanto, las ratas con latencias eyaculatorias cortas o intermedias tienen una presentación genital más grande en S1 en comparación con las ratas que tienen una latencia de eyaculación larga. Esta es una información valiosa para incorporar en la comprensión de las diferencias en la expresión del comportamiento sexual y la posible participación en el desarrollo o la aparición de disfunciones sexuales. Especialmente para ser tenidos en cuenta y usados en posibles desarrollos de nuevas terapias conductuales que involucren información sensorial para tratar la eyaculación precoz y tardía.

El modelo animal propuesto y estudiado para examinar los efectos crónicos de la exposición a los ISRS en el comportamiento sexual ha sido validado una vez más. Las ratas SERT^{-/-} macho tienen un patrón sexual muy bien definido y estable que nos permite estudiar los efectos de la exposición de 5-HT en el cerebro durante toda la vida.

A partir de los diferentes fármacos estudiados, debemos concluir que es necesario realizar más estudios para desarrollar un fármaco que pueda prescribirse como un tratamiento agudo y a demanda para la eyaculación precoz. Aunque el tramadol puede tener el potencial de ser un fármaco para tratar de manera aguda y a demanda la PE, la dosis necesaria puede ser demasiado alta o sus efectos secundarios (adicción) pueden llegar a ser demasiado molestos. Algunos agonistas con sesgo a los receptores 5-HT_{1A} podrían ser útiles para el tratamiento a demanda de la ER y para mejorar la capacidad de un hombre para tener un mejor desempeño sexual, pero los mecanismos subyacentes a tales efectos necesitan investigaciones adicionales.

English Summary

Chapter 1

Background

Male sexual function has been a topic of interest for the scientific community for the last decades. Special attention has been focused on dysfunctions like premature (PE) and delayed ejaculation (DE) in men, which affect a considerable portion of the male world population (20-30%). Although these conditions are not life threatening, they significantly may affect emotionally and interpersonally the relationships of inflicted men. In general, an important factor for the diagnosis of these dysfunctions is that they generally lead to sexual dissatisfaction of the partner and have a very negative impact on the couple. The origins of sexual dysfunctions are motive of controversy as they can be a result of several psychosocial, biological and genetic factors that may emotionally condition a person to have elevated anxiety levels before or during the sexual encounter, resulting in unsuccessful performance. One of the main side effects of selective serotonin transporter inhibitors (SSRIs), which are the first-line treatment for major depression, is a delay in ejaculation. SSRIs are therefore used as treatment for a sexual dysfunction like premature ejaculation. Although these drugs can improve the sexual performance of a certain percentage (45-65%) of men with PE, a large number of them relapses as chronic use of these drugs for PE treatment in the long run may adversely affect ejaculatory and sexual behavior (15%), causing chronic SSRI sexual dysfunction.

On the other hand, delayed ejaculation (DE) is a sexual dysfunction that although is less prevalent than PE, still affects a good number of individuals and so far, its etiology and mechanisms are not well known. The 5-HT_{1A} receptor has been attributed an important role in male sexual behavior as stimulation of this receptor by various 5-HT_{1A}-receptor agonists induce pro-sexual effects in rats. 5-HT_{1A}-receptor agonists like 8-OH-DPAT, but also others, have shown to decrease the latency to the first ejaculation and decrease the number of mounts and

intromissions to reach ejaculation in rats. These 5-HT_{1A} receptor agonists already known are not allowed for human usage, meaning we are in search for new 5-HT_{1A} receptor agonist to treat DE. The pro-sexual effect on sexual behavior caused by 5-HT_{1A} receptor-agonists can be blocked by 5-HT_{1A}-receptor antagonists (e.g. WAY100,635), which on its own have no intrinsic activity. Under basal conditions 5-HT_{1A} receptors may not play a crucial role in sexual behavior, but they become relevant when they are either activated by 5-HT_{1A}-receptor agonists or under conditions of high extracellular 5-HT levels, e.g. induced by SSRIs.

The lack of effectiveness of the current available treatments for sexual disorders indicates that pharmacological and psychosocial-etiological models available at the moment are not sufficient to understand sexual (dys)function.

Research question

The overall aim of this thesis was to investigate further mechanisms involved in the expression of ejaculatory sexual dysfunction. Specifically, we 1) evaluated the role of the somatosensory cortex in the expression of copulatory behavior. 2) studied the role of the SERT in sexual performance by using the SERT knockout rat. A genetic animal model that resembles chronic SSRI induced sexual dysfunction in humans. 3) studied the on-demand effect of tramadol in wildtype Wistar and in SERT^{+/+}, SERT^{+/-} and SERT^{-/-} rats. And lastly 4) evaluated the role of pre- and post-synaptic 5-HT_{1A} receptor biased agonists in the expression of sexual function.

Animal models of sexual dysfunction

The choice of animal models becomes critical when translating scientific knowledge of the human condition. Most of the current understanding about sexual function and ejaculatory function is the result of numerous studies in animal models, particularly the *Rattus Norvegicus Albinus* species. Sexual function, more particularly ejaculation latency, has been widely studied by previous research groups that developed behavioral rat model to study premature and delayed ejaculation. Not only is this animal species the best understood regarding its sexual and

reproductive physiology, but male rats also show variability in their sexual performance once it becomes stable (after 4 to 6 training sessions), notably in different copulatory phenotypes including variants based on the number of ejaculations. The serotonin transporter knockout rat model (SERT^{-/-}) has been previously characterized and the functional consequences in the serotonergic system disturbances on behavioral paradigms have been described. SERT^{-/-} animals have a chronic “natural” exposure to extremely high levels of extracellular serotonin in the brain, which makes these animals a good candidate of a model that resembles chronic administration of SSRIs in humans. The SERT^{-/-} rat model can also be of value to test new antidepressant drugs that possess SSRI properties and additional serotonergic targets, to understand their effects and mechanism of action beyond the SSRI properties in sexual behavior.

Chapter 2

The first set of experiments (**chapter 2**) was dedicated to find possible new brain structures that are related to the expression of sexual function. We showed that the anatomical and functional representation of the external genital organs in the primary somatosensory cortex (S1) of the male rat varied according to the latency of ejaculation of male rats. Animals considered normal and rapid ejaculators have larger cortical representations of the genitals in S1, and those considered slow ejaculators, non-ejaculators or non-copulators have a smaller representation of the genitals in S1. These results support the idea that differences in the expression of copulatory behavior are also regulated by morpho-functional differences in sensory pathways. The expression of sexual behavior does not only depend on traditionally studied actions of neural structures involved in motivation and implementation of sexual and reproductive behavior, but also depends on contributions from the neural structures responsible for processing sensory information. Therefore, it is important to incorporate this concept for understanding the differences in the expression of sexual function.

Chapter 3

Because it is of high importance to have proper animal models to study sexual behavior and the mechanisms related to it, in **chapter 3**, we collected all basal sexual behavioral data produced during the training sessions of our experimental work for this thesis. We tested a large number of rats with genetically modified serotonin transporters (SERTs) and compared them to wildtype rats. Even though it has been previously reported that SERT^{-/-} animals have a different sexual level than SERT^{+/+} or SERT^{+/-}, we described in further detail the differences in sexual performance of animals partially (SERT^{+/-}) or fully (SERT^{-/-}) lacking SERT. We showed that the difference in sexual function between animals with full availability (100%) of the transporter and those without it (0%) are already detected in the second week (of sexual behavior training), in male rats sexually trained. SERT^{-/-} rats displayed reduced number of ejaculations compared with SERT^{+/-} and SERT^{+/+} rats. Although it was previously shown that at the molecular and neurochemical level, these genetically modified animals are different from SERT^{+/+} rats, all our results in all experiments show no difference between SERT^{+/-} rats (50% availability of the transporters) and SERT^{+/+} rats. This suggests that there is no linear relationship between the number of SERT and the level of male sexual behavior, apparently 50% transporters still suffices to perform wildtype-like sexual behavior. We therefore used the SERT^{-/-} rat as animal model for most of our pharmacological experiments and compared them with wildtype animals which display normal or high basal sexual function. Moreover, we searched for new pharmacological therapies against premature ejaculation and used animals with a genetically modified serotonin transporter, to gain further understanding of possible mechanisms of action of these drugs.

Chapter 4

As previously mentioned, the most successful treatments for PE are SSRIs which block the SERT thereby influencing extracellular 5-HT levels which act on various serotonin receptors. SSRI treatment for PE is cumbersome. It needs chronic treatment and is associated with (daily) unwanted side effects. Moreover, except for dapoxetine, SSRIs are prescribed off-label for PE, which actually is an unwanted situation. Therefore, the search of on-demand treatments has become of high importance. In **chapter 4**, we tested the effects of tramadol (a μ -opioid receptor agonist and SSRI/NRI, used more commonly as painkiller) on wildtype animals, as an acute on demand treatment of premature ejaculation. We found that in high doses, tramadol can strongly and acutely inhibit sexual behavior. When we combined it with naloxone (a μ -opioid receptor antagonist), it had some minor but significant antagonizing effects on the inhibitory effects the highest dose of tramadol. These data suggested that the μ -opioid receptor may play a minor role in the inhibition of sexual behavior caused by tramadol, and that the remaining inhibitory effects might be due to stronger SSRI effects at the highest dose. Even though we were able to establish that its prevalent mechanism of action in correcting sexual dysfunction is due mainly to its SSRIs properties, the data collected in this study suggested that the μ -opioid component in tramadol might be contributing to its inhibitory effect over sexual behavior, so therefore testing tramadol on sexual behavior in SERT-knockout rats would help us determine whether the opioid agonistic activity in tramadol exerts sexual inhibitory effects in the absence of the SERT-inhibiting effects of tramadol.

Chapter 5

In **chapter 5**, we performed a set of experiments on SERT knockout rats that confirmed that tramadol's acute main effect on sexual function is related to its SSRI properties and very little or not at all to its μ -opioid receptor agonistic or even to its norepinephrine transporter antagonistic properties. This experiment was designed to help us determine whether the opioid

agonistic activity in tramadol exerts sexual inhibitory effects in the absence of the SERT, a characteristic that the SERT^{-/-} rat model brings along. We tested this drug in SERT^{+/+}, SERT^{+/-} and SERT^{-/-} rats. Like in chapter 4, we found that the high doses of tramadol have an acute inhibitory effect on sexual behavior. However, the decrease of sexual function was present in all 3 genotypes. We administered naloxone (as in chapter 4) and WAY100,635 (a 5-HT_{1A} receptor antagonist) to antagonize the μ -opioid receptor antagonist property of the compound and to block the 5-HT_{1A} receptor activity, respectively. When an intermediate dose of tramadol was administered along with WAY100,625 the sexual function was inhibited (as expected when you link an SSRI and a 5-HT_{1A} receptor antagonist). When combined with naloxone, it was not possible to fully antagonize tramadol's inhibitory effects, in all the genotypes. The fact that even using animals without SERT, tramadol can induce its inhibitory effect on sexual behavior and that naloxone cannot fully antagonize tramadol, suggests that the sensitivity of the μ -opioid system in the brain of SERT^{-/-} rats is not different due to the absence of SERT and that there are other properties of tramadol that have a more important contribution to its inhibitory effects on male sexual activities than the opioid system.

Chapter 6

During our studies, the role of 5-HT_{1A} receptors in the regulation of male sexual behavior has been a topic of interest, because their stimulation by 5-HT_{1A}-receptor agonists possess pro-sexual effects in rats. In **chapter 6** we investigated and tried to gain more understanding about the role of 5-HT_{1A} receptors by using two different biased 5-HT_{1A} receptor agonists in SERT^{+/+} and SERT^{-/-} animals. Stimulation of the 5-HT_{1A} receptor enhances sexual activity, and in this chapter, we focused on animals that during their training sessions performed a relatively low sexual level, so that we could evaluate if the drugs of selection had a pro-sexual effect. We then used two biased 5-HT_{1A} receptor agonists, the autoreceptor-selective 5-HT_{1A} receptor agonist F13714 and the heteroreceptor-selective 5-HT_{1A} receptor agonist F15599, and tested them in

both SERT^{+/+} and SERT^{-/-} rats. Somewhat surprising, both compounds induced pro-sexual activity in SERT^{+/+} and SERT^{-/-} rats, but for F13714 the dose response curve for the pro-sexual effect in SERT^{-/-} rats was shifted to the right compared to SERT^{+/+} rats, meaning that the 5-HT_{1A} auto-receptor is less sensitive in SERT^{-/-} rats. So far, there are no studies that evaluate the selective contributions of 5-HT_{1A} auto-receptors or heteroreceptors (or both). A third compound evaluated was S15535, an autoreceptor selective 5-HT_{1A} receptor agonist and heteroreceptor-selective 5-HT_{1A} receptor antagonist, which did not have any effects on male sexual behavior of SERT^{+/+} and SERT^{-/-} rats, concluding that this particular compound mainly behaves as a ‘silent’ 5-HT_{1A} receptor ligand in male rat sexual behavior. Unfortunately, these studies have not brought new evidence for pre- or postsynaptic mechanisms in the pro-sexual effects of 5-HT_{1A} receptor agonists.

Conclusions

Lastly, in **chapter 7** all our findings (from chapter 2 to 6) are summarized and discussed in further detail, acknowledging the importance of pharmacological treatments to improve control on ejaculation.

In conclusion, we found that there is an anatomical and functional representation of the external genital organs in the primary somatosensory cortex (S1) of the male rat. The area activated in the S1 by stimulation of the external genitals is correlated to the latency of ejaculation. Thus, rats with short or intermediate ejaculatory latencies have a larger genital presentation in S1 compared with rats that have a long ejaculation latency. This is valuable information to incorporate in the understanding of the differences in expression of sexual behavior and the possible involvement in the development or appearance of sexual dysfunctions. Especially to be taken into account and used in possible new development of behavioral therapies that involve sensory information to treat premature and delayed ejaculation.

The animal model proposed and studied to examine chronic SSRIs exposure effects on sexual behavior has been further validated. SERT^{-/-} male rats have a very well defined and stable sexual pattern that enables us to study the effects of lifelong high brain extracellular 5-HT level exposure on sexual behavior.

From the different drugs studied, we have to conclude that we still need to perform more studies to develop a drug that can be prescribed as an on-demand treatment for premature ejaculation. Even though tramadol might have the potential as an on-demand PE drug, the dose needed might be too high or its side effects (addiction) are too troublesome. Some 5-HT_{1A} biased agonists might be of use for on demand treatment to improve a male's ability to better perform sexually, but mechanisms underlying such effects need further investigations.

Nederlandse samenvatting

Hoofdstuk 1

Achtergrond

Mannelijke seksuele disfunctie wordt al een aantal decennia onderzocht. Bijzondere aandacht gaat uit naar problemen met ejaculatie zoals vroegtijdige ejaculatie (premature ejaculatie, afgekort als PE) en vertraagde ejaculatie (delayed ejaculatie afgekort als DE). Ejaculatiestoornissen komen veel voor en kunnen verschillende oorzaken hebben (20-30%). Hoewel er in het algemeen geen sprake is van levensbedreigende situaties, kunnen zulke stoornissen het nodige teweegbrengen bij mannen en hun partners op emotioneel en relationeel vlak. Over de oorzaak van seksuele stoornissen bestaat nog veel onduidelijkheid. Een “niet-succesvolle” ejaculatie kan veroorzaakt worden door een reeks psychosociale, biologische en genetische factoren die tot verhoogde angstgevoelens kunnen leiden voor of tijdens een seksuele activiteit. Eén van de voornaamste bijwerkingen van *selectieve serotonine opname remmers (selective serotonin reuptake inhibitors-SSRI's)*, geneesmiddelen die met voorkeur worden gebruikt bij depressieve stoornissen, is vertraging van de ejaculatie. SSRI's zijn daardoor uiterst behulpzaam bij het behandelen van PE. Alhoewel een groot deel van de mannen met PE beter seksueel presteert na het gebruik van SSRI's (45-65%), zal een aantal van hen na verloop van tijd stoppen omdat bij langdurig chronisch gebruik (15%), SSRI's de ejaculatie en het seksuele gedrag negatief beïnvloeden.

Vertraagde ejaculatie (DE) komt minder vaak voor dan PE, maar treft desondanks een groot aantal individuen. De etiologie van en het mechanisme achter PE zijn nog grotendeels onbekend. Een belangrijke rol in mannelijk seksueel gedrag wordt toegeschreven aan een van de serotonine (5-HT) receptoren, de 5-HT_{1A}-receptor. Stimulatie van deze receptor door een 5-HT_{1A}-receptor agonist kan seksueel stimulerende, oftewel pro-seksuele effecten bij ratten induceren. 5-HT_{1A} receptor agonisten zoals 8-OH-DPAT verminderen de tijd tot de eerste

ejaculatie. Tevens neemt het aantal *mounts* en *intromissies* af om een ejaculatie te bereiken. De gebruikte 5-HT_{1A}-receptor agonisten in ratten zijn helaas niet geschikt voor humaan gebruik. Het vinden en onderzoeken van nieuwe en effectieve 5-HT_{1A} receptor agonisten die wel geschikt zijn om DE in mensen te behandelen is daarom van essentieel belang. De pro-seksuele effecten veroorzaakt door 5-HT_{1A}-receptor agonisten kunnen worden geblokkeerd door 5-HT_{1A}-receptor antagonisten (bijvoorbeeld WAY100,635), stoffen die op zichzelf geen intrinsieke activiteit hebben. Onder basale omstandigheden spelen 5-HT_{1A}-receptoren mogelijk geen cruciale rol in seksueel gedrag, maar ze worden relevant wanneer ze ofwel worden geactiveerd door 5-HT_{1A}-receptor agonisten of wanneer er hoge extracellulaire 5-HT-niveaus aanwezig zijn, b.v. door het gebruik van SSRI's.

Het gebrek aan effectieve beschikbare behandelingen voor seksuele stoornissen geeft aan dat de farmacologische en psychosociaal-etologische modellen die momenteel beschikbaar zijn op dit moment, niet afdoende zijn om seksueel (dis)functioneren te begrijpen.

Onderzoeksvraag

Het algemene doel van dit proefschrift is om verdere mechanismen te onderzoeken die betrokken zijn bij de totstandkoming van seksuele stoornissen gerelateerd aan de ejaculatie. Concreet hebben we 1) onderzocht of de grootte van het gebied dat in de somatosensorische cortex geactiveerd wordt gecorreleerd kan worden aan het copulatiegedrag. 2) de rol van de serotonine transporter (SERT) in seksueel gedrag onderzocht met behulp van de SERT knock-out rat (een genetisch gemodificeerd dier dat model staat voor SSRI-geïnduceerde seksuele disfunctie bij mensen) 3) het *on-demand* effect van tramadol in wildtype Wistar-ratten en in SERT^{+/+}, SERT^{+/-} en SERT^{-/-} ratten onderzocht, en tot slot hebben we 4) de rol van pre- en postsynaptische 5-HT_{1A}-receptor agonisten (zgn. 'biased' agonisten) in seksueel gedrag onderzocht.

Diermodel voor seksuele stoornissen

De keuze van een diermodel is cruciaal voor de translatie van wetenschappelijke kennis naar de mens. Het grootste deel van onze kennis over het seksueel functioneren en ejaculatiestoornissen, is verkregen door onderzoek dat gebruik maakt van diermodellen. Het dier dat in het bijzonder wordt gebruikt is de rat (*Rattus Norvegicus Albinus*). Het seksueel functioneren en in het bijzonder de latentietijd tot ejaculatie, zijn uitgebreid eerder bestudeerd met behulp van een rattenmodel voor vroegtijdige en vertraagde ejaculaties. De rat is het best begrepen diermodel met betrekking tot de seksuele en reproductie fysiologie. Bovendien tonen mannelijke ratten een stabiel seksueel fenotype nadat ze een aantal (4-6) trainingssessies achter de rug hebben. Ratten kunnen in verschillende fenotypes voor copulatiegedrag ingedeeld worden, inclusief fenotypes gebaseerd op het aantal ejaculaties per gedragstest.

De functionele consequenties van een verstoord serotonine systeem op seksueel gedrag zijn in kaart gebracht voor de *serotonin transporter knockout rat* ($SERT^{-/-}$). $SERT^{-/-}$ dieren worden vanaf de vroege ontwikkeling chronisch blootgesteld aan extreem hoge extracellulaire serotonine niveaus in het brein, waardoor ze een grote gelijkenis vertonen met ratten en mensen die chronisch behandeld zijn met SSRIs. De $SERT^{-/-}$ rat is tevens van belang voor het testen van nieuw ontwikkelde antidepressiva met een SSRI-profiel en additionele serotonerge of andere eigenschappen. Zodoende kan men het effect van de additionele eigenschappen onderzoeken, zonder interferentie van het effect van SSRI's (deze werkt immers niet bij de $SERT^{-/-}$ rat), om zo het seksuele gedrag beter te begrijpen.

Hoofdstuk 2

De eerste reeks experimenten (**hoofdstuk 2**) waren gericht op het vinden van mogelijk nieuwe hersenstructuren die gerelateerd kunnen worden aan seksuele prestaties. We hebben laten zien dat de anatomische en functionele representatie van de uitwendige geslachtsorganen in de primaire somatosensorische cortex (S1) van mannelijke ratten verschilden al naar gelang de latentietijd tot de ejaculatie. Dieren die normaal en snel ejaculeren hebben een grotere corticale

representatie van de geslachtsorganen in S1. Ratten die niet of langzaam ejaculeren, of helemaal geen copulatie gedrag laten zien, hebben een kleinere representatie van de geslachtsorganen in S1. Deze resultaten ondersteunen het idee dat verschillen in de expressie van copulatiegedrag ook gereguleerd worden door morfo-functionele verschillen in sensorische routes. Seksuele prestaties hangen dus niet alleen af van de traditioneel bestudeerde acties van neurale structuren die betrokken zijn bij motivatie en implementatie van seksueel en reproductief gedrag, maar hangen ook af van de neurale structuren verantwoordelijk voor het verwerken van sensorische informatie. Het is daarom belangrijk om dit concept mee te nemen om de verschillen in het seksueel functioneren te begrijpen.

Hoofdstuk 3

Omdat het van groot belang is om goede diermodellen te hebben om seksueel gedrag en de eraan verbonden mechanismen te bestuderen, hebben we in **hoofdstuk 3** alle basale seksuele gedragsgegevens verzameld die tijdens de trainingssessies van ons experimentele werk voor dit proefschrift zijn geproduceerd. We testten een groot aantal ratten met genetisch gemodificeerde serotonine transporters (SERT's) en hebben deze vergeleken met wildtype ratten. Hoewel eerder is aangetoond dat SERT^{-/-} dieren een ander seksueel gedragspatroon laten zien dan SERT^{+/+} of SERT^{+/-} dieren, hebben we de verschillen in het seksuele gedrag van dieren met gedeeltelijke (SERT^{+/-}) of volledig ontbrekende (SERT^{-/-}) SERT nader onderzocht. We laten in **hoofdstuk 3** zien dat het verschil in het aantal ejaculaties tussen dieren met volledige beschikbaarheid (100%) van de transporter en diegenen zonder (0%) al zichtbaar is vanaf de tweede week van seksuele gedragstraining. SERT^{-/-} ratten vertoonden een significant verminderd aantal ejaculaties in vergelijking met SERT^{+/-} en SERT^{+/+} ratten. Hoewel eerder werd aangetoond dat deze genetisch gemodificeerde dieren op moleculair en neurochemisch niveau verschillen van SERT^{+/+} ratten, laten al onze resultaten bij alle experimenten geen verschil zien tussen SERT^{+/-} ratten (50% beschikbaarheid van de transporters) en SERT^{+/+}

ratten. Dit suggereert dat er geen lineair verband is tussen het aantal SERTs en het niveau van mannelijk seksueel gedrag, blijkbaar is het hebben van 50% van de transporters nog steeds voldoende om wildtype-achtig seksueel gedrag uit te voeren. Daarom gebruikten we de SERT^{-/-} rat als diemodel voor de meeste van onze farmacologische experimenten en vergeleken ze met wildtype dieren die normale of hoge basale seksuele functie vertonen. Bovendien hebben we gezocht naar nieuwe farmacologische therapieën tegen vroegtijdige ejaculatie. Daarbij gebruikten we dieren met een genetisch gemodificeerde serotoninetransporter om meer inzicht te krijgen in mogelijke werkingsmechanismen van deze geneesmiddelen.

Hoofdstuk 4

Zoals eerdergenoemd, zijn SSRI's het meest succesvol in de behandeling van PE. SSRI's blokkeren de SERT en verhogen daarmee de extracellulaire niveaus van 5-HT. Verhoogde 5-HT niveaus beïnvloeden vervolgens de activiteit van verschillende serotoninereceptoren. SSRI-behandeling voor PE is omslachtig omdat chronische behandeling nodig is wat vaak gepaard gaat met (dagelijkse) ongewenste bijwerkingen. Bovendien worden SSRI's off-label voorgeschreven voor PE, met uitzondering van dapoxetine, hetgeen een ongewenste situatie is. Daarom is het vinden van on-demand-behandelingen van groot belang. In **hoofdstuk 4** hebben we de effecten van tramadol (een μ -opioïde receptoragonist en SSRI/NRI, vaak gebruikt als pijnstiller) als een acute on-demand behandeling van voortijdige ejaculatie getest op wildtype dieren. We hebben vastgesteld dat tramadol in hoge doseringen sterk en acuut het seksueel gedrag kan remmen. Wanneer we tramadol combineerden met naloxon (een μ -opioïde receptorantagonist), zagen we een minimaal, maar significant, antagonistisch effect op de remmende effecten van de hoogste dosering tramadol. Deze gegevens suggereren dat de μ -opioïde receptor mogelijk een kleine rol speelt in de remmende werking van tramadol op het seksuele gedrag. De resterende remmende effecten zijn waarschijnlijk te wijten aan de SSRI-effecten die sterker lijken bij de hoogste dosering dan die van naloxon. Hoewel we in staat

waren om vast te stellen dat het werkingsmechanisme van SSRIs waarschijnlijk het meest belangrijk is bij het corrigeren van seksuele stoornis, suggereren de in dit onderzoek verzamelde gegevens dat de μ -opioïde component in tramadol mogelijk bijdraagt aan het remmende effect ervan op seksueel gedrag. Daarom zou het testen van tramadol op seksueel gedrag in SERT-knock-out ratten ons kunnen helpen te bepalen of de opioïde agonistische activiteit in tramadol de seksuele remmende effecten van tramadol bewerkstelligt.

Hoofdstuk 5

In **hoofdstuk 5** hebben we een reeks experimenten uitgevoerd met SERT knock-out ratten. De uitslagen van deze experimenten bevestigen dat het acute hoofdeffect van tramadol op de seksuele functie gerelateerd is aan de SSRI-eigenschappen en zeer minimaal, tot helemaal niet, aan de agonistische μ -opioïde receptor activiteit of antagonistische noradrenaline-transporter activiteit. Dit experiment was opgezet om te ontrafelen of de opioïde agonistische activiteit in tramadol seksuele remmende effecten uitoefent in afwezigheid van de SERT, waarvoor we het SERT^{-/-} ratmodel gebruikten. We testten tramadol in SERT^{+/+}, SERT^{+/-} en SERT^{-/-} ratten. Zoals in hoofdstuk 4 al was geconstateerd, vonden we wederom dat tramadol in hoge dosering een acuut remmend effect heeft op seksueel gedrag, maar bleek ook dat de afname van de seksuele activiteit in alle drie genotypen aanwezig was. We hebben naloxon (zoals in hoofdstuk 4) en WAY100,635 (een 5-HT_{1A}-receptorantagonist) toegediend om de μ - opioïde receptor en de 5-HT_{1A}-receptoractiviteit respectievelijk te antagoniseren. Wanneer een intermediaire dosis tramadol werd toegediend samen met WAY100,625, werd de seksuele functie geremd (zoals verwacht wanneer men een SSRI en een 5-HT_{1A}-receptorantagonist koppelt). Wanneer tramadol in combinatie met naloxon gegeven werd, was het niet mogelijk om in alle genotypen de remmende effecten van tramadol volledig te blokkeren. Het feit dat tramadol in dieren zonder SERT het remmende effect op seksueel gedrag kan induceren en dat naloxon tramadol niet volledig kan antagoniseren, suggereert dat de gevoeligheid van het μ -opioïdensysteem in

de hersenen van SERT^{-/-} ratten niet veranderd is als gevolg van de afwezigheid van SERT en dat er andere eigenschappen van tramadol zijn die een belangrijkere bijdrage leveren aan de remmende effecten op mannelijke seksuele prestaties dan het opioïde systeem.

Hoofdstuk 6

Tijdens ons onderzoek is de rol van 5-HT_{1A}-receptoren in de regulatie van mannelijk seksueel gedrag een aandachtspunt geweest, aangezien hun stimulatie door 5-HT_{1A}-receptoragonisten pro-seksuele effecten heeft bij ratten. In **hoofdstuk 6** hebben we onderzocht en geprobeerd meer inzicht te krijgen in de rol van 5-HT_{1A}-receptoren door twee verschillende biased 5-HT_{1A} receptor agonisten te gebruiken in SERT^{+/+} en SERT^{-/-} dieren. Stimulatie van de 5-HT_{1A}-receptor verhoogt de seksuele activiteit en in dit hoofdstuk hebben we ons gericht op dieren die tijdens hun trainingssessies een relatief laag seksueel niveau hebben laten zien, zodat we konden evalueren of de geselecteerde drugs een pro-seksueel effect hebben. Vervolgens gebruikten we twee biased 5-HT_{1A}-receptoragonisten, de autoreceptor-selectieve 5-HT_{1A}-receptoragonist F13714 en de heteroreceptor-selectieve 5-HT_{1A} receptoragonist F15599 en testten we deze in zowel SERT^{+/+} als SERT^{-/-} ratten. Tegen onze verwachting in induceerden beide agonisten pro-seksuele activiteit in SERT^{+/+} en SERT^{-/-} ratten. De dosis-responscurve voor het pro-seksuele effect van F13714 in SERT^{-/-} ratten was naar rechts verschoven in vergelijking met SERT^{+/+} ratten, hetgeen betekent dat de 5-HT_{1A} auto-receptor minder gevoelig is in SERT^{-/-} ratten. Tot nu toe bestaan er geen studies die de selectieve bijdragen van 5-HT_{1A}-auto-receptoren of heteroreceptoren (of beide) in seksueel gedrag evalueren. Naast F13714 en F15599 hebben we een derde 5-HT_{1A} receptor agonist onderzocht. S15535 is een autoreceptor-selectieve 5-HT_{1A}-receptor agonist en een antagonist voor de heteroreceptor-selectieve 5-HT_{1A}-receptor. S155355 had geen effect op de seksuele prestaties van de SERT^{+/+} en SERT^{-/-} ratten. We concluderen dat deze specifieke stof zich voornamelijk als een 'stille' 5-HT_{1A}-receptorligand gedraagt in seksueel gedrag van mannelijke ratten. Helaas hebben deze onderzoeken geen nieuw

bewijsmateriaal opgeleverd voor de rol van pre- of postsynaptische mechanismen in de pro-seksuele effecten van 5-HT_{1A}-receptoragonisten.

Conclusies

Ten slotte worden in **hoofdstuk 7** al onze bevindingen (van hoofdstuk 2 tot 6) in detail samengevat en bediscussieerd en het belang van farmacologische behandelingen om de controle op de ejaculatie te verbeteren wordt weergegeven. Concluderend vonden we dat er een anatomische en functionele weergave is van de uitwendige geslachtsorganen in de primaire somatosensorische cortex (S1) van de mannelijke rat. Het functionele activeringsgebied van de uitwendige geslachtsdelen van S1 varieerde volgens de latentietijd tot de ejaculatie. Deze is hoger bij ratten met korte of middellange latenties vergeleken met ratten met een lange latentietijd.

Dit is waardevolle informatie bij het begrijpen van de verschillen in seksuele prestaties en de mogelijke betrokkenheid bij de ontwikkeling of het optreden van seksuele stoornissen. Deze kennis dient vooral in acht te worden genomen bij mogelijk nieuwe ontwikkelingen van gedragstherapieën waarbij sensorische informatie wordt gebruikt om voortijdige en vertraagde ejaculatie te behandelen. Het diermodel dat is voorgesteld en onderzocht om chronische blootstellingseffecten van SSRI's op seksueel gedrag te onderzoeken, is verder gevalideerd. SERT^{-/-} mannelijke ratten hebben een zeer goed gedefinieerd en stabiel seksueel patroon dat ons in staat stelt de effecten van levenslange blootstelling aan extracellulair 5-HT-niveau van de hersenen op seksueel gedrag te bestuderen. Uit de verschillende bestudeerde geneesmiddelen moeten we concluderen dat we nog steeds meer onderzoek moeten uitvoeren om een medicijn te ontwikkelen dat kan worden gebruikt als on-demand behandeling voor premature ejaculatie. Hoewel tramadol de potentie heeft om als on-demand PE-medicijn te dienen, kan de benodigde dosis te hoog zijn of de bijwerkingen (verslaving) ongewenst. Sommige 5-HT_{1A} biased agonisten kunnen van nut zijn voor on-demand behandelingen om het vermogen van een man

om seksueel beter te presteren te verbeteren, maar de mechanismen die aan dergelijke effecten ten grondslag liggen, moeten verder worden onderzocht.

Capítulo 1

Introducción

1. Introducción

El Manual estadístico y de diagnóstico (DSM-V) define las disfunciones sexuales como "un grupo heterogéneo de trastornos que normalmente se caracterizan por una alteración clínicamente significativa en la capacidad de una persona para responder sexualmente o para experimentar placer sexual" (American Psychiatric Association, 2014). Estas disfunciones vienen en un rango muy amplio que incluye trastornos de la eyaculación (tardía o prematura), disfunción eréctil, trastorno orgásmico femenino y masculino, trastorno de deseo sexual/excitación sexual femenina, vaginismo, dispareunia, trastorno de deseo sexual hipoactivo masculino, disfunción sexual inducida por sustancias/fármacos, otra disfunción sexual especificada y disfunciones sexuales no especificadas (American Psychiatric Association, 2014).

Los trastornos idiopáticos de la eyaculación masculina (tardía o prematura) afectan alrededor del 20-30% de la población masculina en el mundo (Tabla 1; Laumann et al., 2005; Laumann, Paik, & Rosen, 1999). Estos números se basan en cuestionarios que hacen preguntas sobre la presencia de problemas sexuales durante un período de 2 meses o más durante los últimos meses. A pesar de que estas condiciones no son potencialmente mortales, pueden generar situaciones de estrés emocional que afectan significativamente la condición de salud general y las relaciones interpersonales de los hombres que lo padecen y sus parejas. Además, a largo plazo, los trastornos de la eyaculación pueden predisponer a los hombres al desarrollo de disfunción eréctil, infertilidad, aneyaculación, deseo sexual hipoactivo, astenia sexual, aversión sexual y/o anorgasmia (Jannini, Simonelli, & Lenzi, 2002). Por lo tanto, es lamentable que la comunidad médica aún tenga dificultades para encontrar las causas de estos trastornos. Esta situación se produce ya que la mayoría de los hombres que sufren dichos trastornos, no tienen alteraciones anatómicas y fisiológicas obvias. Entre los trastornos de la eyaculación, el más frecuente es la eyaculación precoz (EP; Jannini & Lenzi, 2005a, 2005b). Aunque su definición

clínica sigue siendo ambigua debido a la falta de criterios claros (Jannini y Lenzi, 2005b), generalmente la EP se diagnostica cuando un hombre tiene una latencia de eyaculación de menos de dos minutos después del comienzo de la relación sexual, precedida por un pequeño número de intrusiones (<12, movimientos pélvicos), que generalmente conducen a la insatisfacción sexual de la pareja y que puede tener un impacto muy negativo en la pareja. Como es el caso de otros trastornos de la eyaculación, la etiología de la EP es motivo de controversia (Althof et al., 2010; Emmanuele A Jannini & Lenzi, 2005; D. Rowland et al., 2010). Sin embargo, se piensa que la EP se produce como resultado de varias situaciones psicosociales que condicionan emocionalmente a un hombre de tal manera que su nivel de ansiedad aumenta antes o durante el encuentro sexual (Althof et al., 2010; Emmanuele A. Jannini & Lenzi, 2005; D. Rowland et al., 2010). Por esta razón los tratamientos más comúnmente utilizados para la EP se centran en la reducción de la ansiedad mediante la administración de ansiolíticos y antidepresivos (inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, ISRS), apoyados por la práctica de técnicas de relajación y asistiendo a cursos de educación sexual (Althof, 2006; Emmanuele A Jannini & Lenzi, 2005; Rosen & Althof, 2008; D. Rowland et al., 2010). La inhibición del comportamiento sexual por los ISRS está causada principalmente por el aumento de la serotonina en la hendidura sináptica debido a la inhibición del transportador de serotonina (SERT). Un aumento general de la serotonina conduce probablemente a través de la activación del receptor específico en múltiples áreas del cerebro a una disminución de la función sexual, aunque existe información limitada sobre qué receptores de serotonina están mediando el comportamiento sexual (de Jong et al., 2006; Hull & Dominguez, 2007; Snoeren et al., 2014). Algunos de los ISRS de uso común en la actualidad para el tratamiento de la EP son paroxetina, fluoxetina, sertralina y clomipramina, entre otros; sin embargo, los efectos secundarios (indicados en la Tabla 2) después de la administración crónica pueden llevar a dejar el tratamiento y la recaída. Por lo tanto, todas las acciones y tratamientos descritos anteriormente

mejoran el rendimiento sexual de un cierto porcentaje (45- 65%) en hombres con EP. La discontinuación de la medicación para la EP causa recaída en un gran número de hombres (30-70%) (Althof et al., 2010; Jannini & Lenzi, 2005a, 2005b; Rowland et al., 2010; Symonds et al., 2003), o lleva al incumplimiento del tratamiento cuando los efectos secundarios (Tabla 2) de la administración crónica de SSRI afectan adversamente la función eyaculatoria y sexual (Corona et al., 2012; Jannini & Lenzi, 2005b; Waldinger, 2007). La falta de un tratamiento eficaz para la EP sugiere que los modelos etiológicos psicosociales y neurobiológicos disponibles no son suficientes para comprender completamente esta condición; pero, por otro lado, el hecho de que los hombres con disfunciones sexuales puedan mostrar alguna mejoría con el uso de medicamentos, sugiere también que los trastornos como la EP tienen componentes biológicos importantes.

Tabla 1. Prevalencia de los trastornos de la eyaculación en varones (Laumann et al., 2005, 1999; los varones pueden padecer uno o más de los trastornos).

Región	Deseo sexual hipoactivo	Anorgasmia	Eyaculación precoz	Coitalgia	Falta de placer	Disfunción eréctil
Norte América	17.6%	14.5%	27.4%	3.6%	12.1%	20.6%
Centro y Sudamérica	12.6%	13.6%	28.3%	4.7%	9%	13.7%
Toda América	15.1%	14.5%	27.85%	4.15%	10.5%	17.15%

Tabla 2. Terapias farmacológicas y psicomotoras más frecuentemente utilizadas para procurar el manejo clínico de la eyaculación precoz masculina (Jannini et al., 2002).

Fármaco	Dosis	N	Diseño experimental	Eficacia	Efectos secundarios
Fluoxetina	20-40 mg	17	Doble ciego vs placebo	+++	Nausea Dolor de cabeza Insomnio
Fluoxetina	40 mg	36	Doble ciego cruzado vs placebo	+	Somnolencia
Sertralina	100 mg			++	Somnolencia
Clomiparmina	50 mg	24	Estudio dosis-respuesta	+++	Boca seca
Sertralina	50-100 mg			+++	Somnolencia
Sertralina	25 mg	46	Abierto	+	Aneyaculación
	50 mg			++	Mareo
	100 mg			+++	Somnolencia Impotencia

Sertralina	50 mg	37	Ciego vs placebo	++	Dispepsia Somnolencia
Paroxetina	20 – 40 mg	8-34	Doble ciego, azaroso vs placebo	+++	Dispepsia Fatiga
Paroxetina	20 mg	94	Abierto: tratamiento diario vs “por demanda”	+++	Bostezos Aneyaculación Libido reducida
Clomipramina	10-40 mg	16	Doble ciego vs placebo	-	Libido reducida
Clomipramina	25-50 mg	15	Doble ciego vs placebo	+++	Boca seca Sensación de “sentirse diferente” Estreñimiento
Clomipramina	25 mg	23	Doble ciego vs “la demanda” del placebo	+++	-
Clomipramina	25 mg	14	Doble ciego vs placebo	+++	Boca seca Fatiga Mareo
Clomipramina	25 -50 mg	31	Doble ciego	++	Boca seca
Sertralina	50 mg		azaroso cruzado		
Paroxetina	20 mg			+	Libido reducida
Sildenafil	50 mg			++	
Pausa-apretón	-			+++	
Paroxetina	20 mg	48	Doble ciego vs placebo	+++	-
Sertralina	50 mg			+	
Nafozodona	400 mg			-	
clomipramina	25mg nec.	4	Eventual	-	Libido reducida.
	10mg/día			+	
	20mg/día			++	
	30mg/día			+++	
Terapia	Técnicas				
Ejercicios de Kegel	1. Contraer los músculos pubococcígeos por 5 s y soltar por 5 s. Repetir 5 veces. 2. Contraer los músculos pubococcígeos 5 veces tan rápido como sea posible. 3. En la misma sesión, repetir los puntos 1 y 2 (total: 30 contracciones) 4. Realizar 5 sesiones al día (total: 150 contracciones)				
Conductual	1. Parar/Empezar / Masturbación interrumpida 2. Masturbarse antes de la relación sexual. 3. Técnica del apretón, para controlar la eyaculación. 4. Centrarse en las sensaciones 5. Técnica de distracción/centrarse 6. Uso de cremas, lociones y anestésicos locales. 7. Uso de condones más gruesos.				
Pareja	1. Terapia de pareja				

2. La rata como modelo para estudiar las disfunciones sexuales.

En cada proyecto de investigación básica que intenta traducir el conocimiento científico de la condición humana, la elección de modelos animales se vuelve crítica. En este sentido, probablemente no haya mejor modelo que las especies de *Rattus Norvegicus Albinus* para estudiar el impacto del contexto en el que se produce el encuentro sexual en relación con los

mecanismos copulatorios morfo-funcionales que determinan el comportamiento copulador (Heijkoop, Huijgens, & Snoeren, 2018). La mayor parte de la comprensión actual sobre la función sexual y la función eyaculatoria es el resultado de estudios en estas especies animales. Basado en la "teoría de la distribución de la eyaculación" (Marcel D. Waldinger, 1998), que establece que el tiempo de latencia de la eyaculación en los hombres está representado en un continuo biológico (curva de distribución, lo que significa que existe una variabilidad biológica del tiempo de la eyaculación intravaginal). Los grupos de investigación anteriores dedicaron un gran esfuerzo para desarrollar un modelo animal que pudiera servir para estudiar la eyaculación precoz y tardía (Marcel D. Waldinger & Olivier, 2005). Esta especie animal no solo es la mejor entendida en cuanto a su fisiología sexual y reproductiva, sino que las ratas macho también muestran variabilidad en su rendimiento sexual una vez que se estabiliza (después de 4 a 6 sesiones de entrenamiento), especialmente en diferentes fenotipos copuladores, incluidas las variantes según el número de las eyaculaciones realizadas durante una prueba de 30 minutos que las clasifica en ratas eyaculadoras rápidas, normales y lentas, con representaciones rápidas y lentas (cada una) aproximadamente 10-20% en ambos extremos de una distribución en forma de U invertida (Figura 1; Olivier et al., 2006; Pattij et al., 2005; Waldinger & Olivier, 2005).

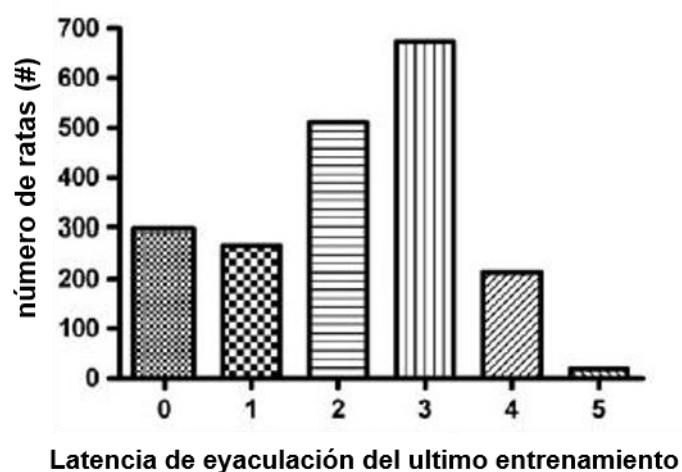


Figura 1. Distribución de más de 1900 ratas macho probadas durante un período de 5 años en pruebas sexuales de 30 minutos (una vez a la semana durante solo 4 semanas). La gráfica muestra el número de animales que mostraron de 0 a 5 eyaculaciones en la última prueba. Los animales con 0 o 1 eyaculación/prueba se describieron como "lentos"; animales con 2 a 3 eyaculaciones/prueba como "normales" y animales con 3 o más eyaculaciones/prueba como "rápidos", [Gráfica de Olivier et al., 2011, con permiso de Springer Nature]

En ambientes naturales, las ratas son animales gregarios y durante la fase de receptividad del ciclo estral, las ratas se aparean con varios machos que promueven la competencia sexual y de esperma (Donald A. Dewsbury & Hartung, 1980; McClintock & Anisko, 1982); condiciones que pueden ser replicadas en cautiverio (Donald A. Dewsbury & Hartung, 1980; Pound & Gage, 2004). El comportamiento sexual en la rata macho consta de tres fases: 1) la fase precopulatoria, 2) la fase copulatoria y 3) la fase ejecutiva (Heijkoop et al., 2018; K. Larsson, 1956). La fase precopulatoria consiste en la identificación, el cortejo y el contacto con la pareja del macho y la hembra receptiva; la rata macho generalmente comienza un encuentro sexual oliendo la región facial y anogenital de la hembra, lo que los expone a estímulos quimiosensitivos que brindan información sobre su receptividad (Lucio et al., 2012). En la fase copulatoria, la hembra atrae la atención del macho con comportamientos proceptivos como el meneo de orejas, saltos (saltos pequeños y movimientos fuera de control) y solitación (Anders Ågmo, 2014). El macho intenta montar a la hembra; se observa una monta cuando el macho sujeta a la hembra por la espalda y empuja su pelvis en un intento por ubicar la vagina con su pene (figura 2). Si este tiene éxito, entonces la monta se acompaña de un impulso más profundo, esta acción se conoce como intromisión (figura 2). El movimiento característico de una intromisión se puede distinguir de una monta por un profundo empuje y un rápido desmonte de la hembra. Cuando el macho desmonta a la hembra, muestra un corto salto hacia atrás, a veces entre montas e intromisiones, el macho limpia sus genitales. Finalmente, la fase ejecutiva del macho consiste en la eyaculación (figura 2). En promedio, la eyaculación ocurre después de 10 a 12 intromisiones y es seguida por un período refractario que dura de 4-8 minutos durante el cual el macho se abstiene de la actividad sexual (Elaine M Hull & Dominguez, 2007; Lucio et al., 2012).

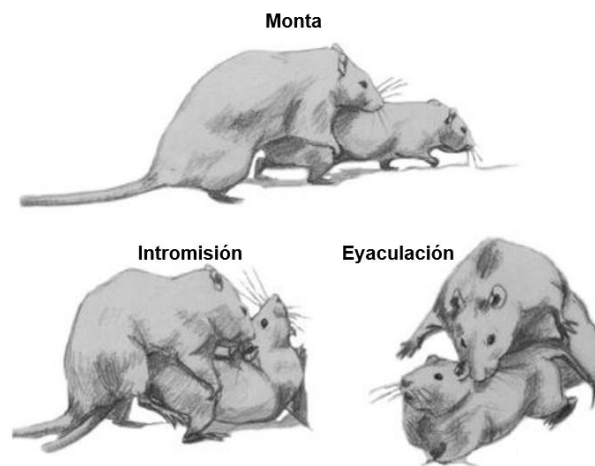


Figura 2. Diagramas que muestran patrones motores copulatorios en la rata macho. En la monta, el macho palpa y sujeta los flancos de la hembra, realiza movimientos pélvicos en la grupa de esta última y provoca el reflejo de lordosis. En la intromisión, el macho inserta el pene en la vagina por medio de movimientos pélvicos realizados en la grupa de la hembra. Finalmente, la eyaculación resulta en respuesta a un movimiento pélvico profundo y sostenido. Al final, el macho extiende lateralmente las extremidades superiores, levanta la espalda y desmonta lentamente a la hembra. [Reproducido de Timmermans -ver figura 1 en Snoeren et al., 2014]

Se piensa que las intromisiones aumentan la excitación sexual, y el número de intromisiones que preceden a la eyaculación podría ser un indicador de la facilidad con que se activa el reflejo de la eyaculación (Lucio et al., 2012). En general, los machos logran la penetración vaginal en 50 a 80% de las montas.

Como se mencionó anteriormente, el uso crónico de los ISRS puede resultar en el aumento del umbral de eyaculación; que se traduce en una latencia de eyaculación retardada o, a veces, incluso en ausencia de eyaculación. Los estudios en ratas muestran que cuando los ISRS se administran de forma crónica, el comportamiento sexual se altera y la cantidad de estimulación sensorial necesaria para alcanzar la eyaculación podría aumentar (Chan et al., 2010; de Jong et al., 2005a, 2005b). Chan et al. (2011) mostró la relevancia del transportador de serotonina (SERT) en la expresión del comportamiento sexual mediante el uso de animales genéticamente modificados ($Sic6a4^{1Hubr}$ generados por mutagénesis de objetivo seleccionado guiada por etilnitrosourea (ENU), para mayores detalles ver Smits et al., 2006) para este transportador en

rata ($SERT^{-/-}$ y $SERT^{+/-}$) como modelo animal para la disfunción sexual inducida por administración crónica de ISRS. Las ratas $SERT^{-/-}$ tienen niveles cerebrales extracelulares de serotonina más altos que los animales $SERT^{+/-}$ y $SERT^{+/+}$ en la hendidura sináptica (J. R. Homberg et al., 2007) que es comparable a los animales bajo administración crónica de ISRS (Chan et al., 2010; Olivier et al., 2010; Olivier et al., 2008). En el lado del comportamiento, las ratas $SERT^{-/-}$ tienen altos niveles de ansiedad y comportamientos parecidos a la depresión (Olivier et al., 2008; Olivier et al., 2010; Rothman et al., 2003). En su investigación, Chan et al. (2011) plantearon la hipótesis de que estos animales modificados genéticamente a este transportador muestran comportamientos sexuales alterados comparables a los expresados por animales bajo administración crónica de ISRS (de Jong et al., 2005a; Ferguson, 2001; Oosting et al., 2016). De hecho, Chan et al (2011) mostraron que los animales $SERT^{-/-}$ muestran una disminución en el comportamiento sexual y sugieren que un grupo sensibilizado de receptores $5-HT_{1A}$, está involucrado en la regulación de las actividades sexuales en ratas $SERT^{-/-}$. La similitud del comportamiento sexual de las ratas $SERT^{-/-}$ con el comportamiento sexual expresado cuando los ISRS son utilizados crónicamente, sugiere que este animal modificado genéticamente puede ser un modelo muy útil para estudiar el papel de la serotonina en disfunciones sexuales como la eyaculación retardada o la disminución de la pro-actividad sexual.

El modelo de la rata $SERT^{-/-}$ también puede ser importante para poder evaluar nuevos fármacos antidepresivos como la vilazodona y vortioxetina que poseen propiedades de ISRS y objetivos serotoninérgicos adicionales como los receptores $5-HT_3$, $5-HT_7$, $5-HT_{1B}$ y $5-HT_{1D}$ (Li et al., 2017; Oosting et al., 2016), para comprender sus efectos y mecanismos de acción en el comportamiento sexual.

En general, se asume que los ISRS pueden inducir disfunción sexual como un efecto secundario principal, primariamente relacionado con la capacidad disminuida para eyacular y alcanzar

orgasmos (Chan et al., 2010; Hull, Wood, & McKenna, 2006). Pero los mecanismos particulares de los antidepresivos, como los ISRS, afectan la función sexual, aún son en gran parte desconocidos, aunque se han formulado hipótesis sobre las adaptaciones en los receptores serotoninérgicos 5-HT₃, 5-HT₇, 5-HT_{1B} y 5-HT_{1D}. Se realizaron varios estudios doble ciego y se encontraron diferencias particulares significativas entre los diferentes ISRS sobre sus efectos en el retraso de la eyaculación en hombres que presentan eyaculación rápida de por vida (prematura) (Segraves & Balon, 2014; Waldinger, Zwinderman, & Olivier, 2001a, 2001b). Estos efectos pueden depender de la dosis clínica utilizada que genere diferentes niveles de ocupación del transportador 5-HT, pero otros factores y mecanismos (por ejemplo: metabolitos, farmacocinética) también deben estar jugando un papel (Waldinger, 2007).

Además de su papel en la expresión normal del comportamiento sexual masculino, Waldinger et al (2002; 2005; 1998) postularon que la serotonina desempeña una función importante en la etiología de la EP permanente, la cual también es una disfunción sexual determinada genéticamente. En 1998, Waldinger y sus colegas (Waldinger, 1998) propusieron que este componente genético puede ser causado por una alteración en el sistema del receptor serotoninérgico, por ejemplo, la hiposensibilidad del receptor 5-HT_{2C} y / o la hipersensibilidad del receptor 5-HT_{1A}. Se ha demostrado que el tratamiento diario con los ISRS actualmente disponibles es eficaz para retrasar la eyaculación en hombres con EP (Bijlsma, 2014). Sin embargo, el uso crónico de estos medicamentos (principalmente para tratar la depresión mayor) conlleva una serie de efectos secundarios sexuales impotencia, aneyaculación, y disminución de la libido que también conducen a una disfunción sexual (Bijlsma et al., 2014). La depresión mayor a menudo se asocia con disfunciones sexuales y el tratamiento con antidepresivos puede complicar la situación considerablemente. Mientras que algunos aspectos del funcionamiento sexual pueden mejorar, otros, como la erección y la eyaculación, pueden deteriorarse (Lahon et al., 2011). A menudo es difícil o imposible determinar qué es lo que causa la depresión y qué

es lo que causa el antidepresivo o su interacción o incluso por otros factores (Olivier et al., 2017). Lahon et al. (2011) plantearon que cuando un paciente presentaba síntomas de disfunción sexual, esto podría ser un fuerte indicador de que el tratamiento prescrito no estaba funcionando o que podría también deberse a efectos secundarios del mismo tratamiento. La gran mayoría de los antidepresivos comúnmente recetados están asociados a efectos secundarios sexuales como la pérdida del deseo sexual y otros problemas sexuales, como la disfunción eréctil y la disminución del orgasmo, que a menudo conducen al incumplimiento del tratamiento (Lahon et al., 2011).

Los tratamientos efectivos para tratar la EP hasta ahora requieren la administración de ISRS durante al menos 2 semanas para comenzar a tener efecto (Waldinger et al., 1998; 2001a; 2001b). Sin embargo, la administración crónica de dichos medicamentos (ISRS) también puede provocar una disfunción sexual grave como la dificultad para eyacular que puede llevar a los pacientes a interrumpir el tratamiento. El inicio lento de la acción de los ISRS en la EP, la necesidad de tomar los ISRS de forma permanente y tales efectos secundarios graves apoyan el hallazgo y el desarrollo de tratamientos "a demanda" (agudos) sin los efectos secundarios de los ISRS (Waldinger, 2002; 2006). El hallazgo de que la combinación de un ISRS con un antagonista del receptor 5-HT_{1A} (por ejemplo, WAY100,635) puede llevar a una disminución en la latencia de la eyaculación, sugiere la posibilidad de desarrollar tales tratamientos a demanda (Chan et al., 2011; de Jong et al., 2005; de Jong et al., 2006; Keel et al., 2010).

Recientemente, surgieron propuestas de que el tramadol podría tener efectos inhibidores de la demanda sobre la PE (Yang et al., 2013). El tramadol se usa principalmente como analgésico debido a su perfil como agonista selectivo del receptor μ -opioide, por su efecto inhibitorio de la recaptura serotoninérgica (ISRS) relativamente fuerte y el efecto inhibitorio de la recaptación de norepinefrina (más débil) (Matthiesen et al., 1998), ha sido sugerido como responsable de sus propiedades anti-PE (Rojas-Corrales et al., 2002; 1998). Recientemente, se ha demostrado

que el tramadol, como aplicación fuera de etiqueta, es decir no solamente utilizado como analgésico, es eficaz en el tratamiento de la eyaculación precoz en humanos (Eassa & El-Shazly, 2013; Yang et al., 2013), comparable a los resultados de otros ISRS (Waldinger et al., 1998; Waldinger et al., 2001a, 2001b; Waldinger & Olivier, 2004).

3. Neurobiología de la función sexual (eyaculación)

La latencia de la eyaculación es una variable biológica que puede diferir entre poblaciones y rangos desde muy rápido (EP), en promedio y hasta el retraso de la misma (eyaculación retardada). Las teorías biológicas sobre la EP incluyen las teorías de la evolución, la hipersensibilidad del pene, los niveles de neurotransmisores y la sensibilidad de sus receptores en el sistema nervioso central, el nivel de las hormonas sexuales, el grado de excitación y la rapidez del reflejo eyaculatorio (Waldinger, 2002; 2005)

3.1 Sistemas sensoriales

Cuando se trata del sistema sensorial, poco se conoce realmente sobre el papel de la mayoría de estos sistemas en la expresión del comportamiento sexual; aunque está claro que la visión, el olfato, el oído, el gusto y el tacto son elementos clave en la ejecución del sexo, la disponibilidad de datos sobre el papel de estos sistemas sensoriales en la función sexual es muy limitada (Ryan, 1990). En el caso de los roedores y debido a su accesibilidad para evaluarlo, el sistema olfativo se ha estudiado más ampliamente (Portillo et al., 2006). El bulbo olfatorio está a cargo de la transmisión de la señal quimiosensorial de la mucosa olfatoria y el órgano vomeronasal a los centros superiores del cerebro anterior. Las señales quimiosensoriales,

aunque están presentes entre las especies, tienen una importancia variable relacionada con otras señales sensoriales como la visión, la audición y el tacto, según la biología de la especie. Estas señales quimiosensoriales son predominantemente importantes para el apareamiento en roedores. Por lo tanto, el sistema olfativo se vuelve muy relevante para estas especies. El órgano vomeronasal puede detectar algunas señales de olor volátil y su función principal es la de detectar feromonas (Trinh & Storm, 2003) y los estímulos transducidos en el órgano vomeronasal son particularmente importantes para el comportamiento social, incluidos el apareamiento, la agresión, la afiliación y el comportamiento materno en roedores y animales que dependen en gran medida del sentido de olor (Edwards & Burge, 1973, para revisión Hull & Dominguez, 2007a). Sin embargo, en especies microsmáticas (con un mal sentido del olfato) que incluyen seres humanos, el órgano vomeronasal y los bulbos olfatorios accesorios están disminuidos y pueden no ser funcionales (Coolen & Hull, 2004; Hull et al., 2006). En ratas y ratones machos, el apareamiento o la exposición a feromonas de la hembra en estro estimula la expresión de la proteína Fos (un gen de expresión temprana usado para medir la activación neural) en los bulbos olfatorios accesorios y las estructuras posteriores (Portillo et al., 2013).

El sentido del tacto también es muy relevante, ya que las señales ascendentes del pene y la región perineal transmitidas a través del núcleo subparafascicular van a la amígdala medial (MeA). Estas señales somatosensoriales se llevan directamente al área preóptica medial (MPOA, figura 3). Cada intromisión proporciona una gran cantidad de estimulación somatosensorial debido a la alta densidad de receptores sensoriales localizados en las espinas

que cubren el glande del pene. Cuando esta estimulación sensorial se acumula, eventualmente activa los reflejos relacionados con la emisión seminal y los reflejos autonómicos asociados con la eyaculación somática (Lucio et al., 2012). La amígdala cortical medial y posteromedial también tiene abundantes receptores para los andrógenos y los estrógenos (Snoerenet al., 2014). La testosterona es en parte responsable de promover la actividad sexual masculina, a través de la vinculación con los receptores de andrógenos amígdaloides o los receptores de estrógenos después de la aromatización. La información sensorial generada por la estimulación mecánica de los órganos genitales externos se envía a la corteza somatosensorial primaria (S1), a través de una vía tri-sináptica que involucra a la columna dorsal y el lemnisco medio (por el aferente sensorial primario tipo A, que va desde la raíz dorsal hasta el asta dorsal de la región lumbo-sacra de la médula espinal. Una vez que la señal llega a la sustancia gelatinosa del asta dorsal esta se transmite a través de las neuronas Las fibras de estas ascienden ipsilateralmente hacia el núcleo de Gracilis en la médula oblongada por el funículo dorsal de la médula espinal. Después de un segundo relevo, las fibras gráciles pasan a través de la comisura anterior y se elevan contra lateralmente, pasando a través del lemnisco medial al complejo nuclear ventrobasal en el tálamo. Finalmente, las neuronas talámicas proyectan a través de la cápsula interna a través de la corona irradiada hacia la corteza somatosensorial primaria (; Cazala, Vienney, & Stoléru, 2015; Kell, 2005) Figura 4. En el caso de los roedores, la S1 tiene una representación del cuerpo formado por módulos citoarquitectónicos de diferentes tamaños llamados barriles (Averman et al., 2012; Riddle et al., 1992). Aunque una representación genital aún no se ha descrito

anatómicamente en S1, estudios electrofisiológicos recientes indican que la representación genital en la rata se ubica en la porción ventral de la representación del tronco y se extiende a los segmentos representaciones proximales de las extremidades anteriores y posteriores (Cazala et al., 2015; Lenschow et al., 2015), lo que podría ser una consideración importante del proceso de entrada sensorial genital.

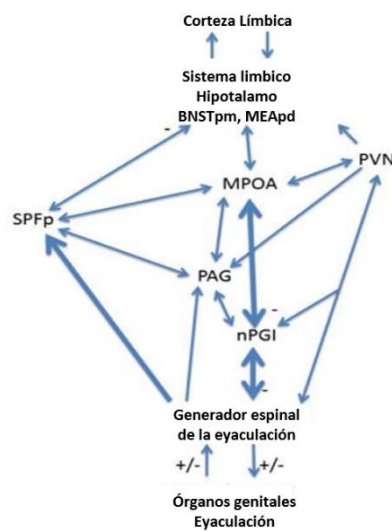


Figura 3. Diagrama de las áreas del cerebro involucradas en los circuitos de eyaculación. La información (input positivo o negativo) entra por los órganos genitales donde pasa a través del órgano generador de la eyaculación que a su vez la envía a distintos sitios de relevo hasta llegar al sistema y corteza límbicos, donde las señales se transducen y son devueltas a través de estos sitios de procesamiento y relevo hasta regresar a los órganos genitales. BNSTpm= parte posteromedial del núcleo del lecho de la estría terminal, MEApd=parte posterodorsal de la amígdala medial, SPFP= núcleo subparafascicular, MPOA= área preóptica medial, PVN= núcleo paraventricular, PAG= gris periaqueductal, nPGI= núcleo paragigantocelular. (+/-: entrada o salida e -: inhibición). [Diagrama de Snoeren et al., 2014; con permiso de Elsevier]

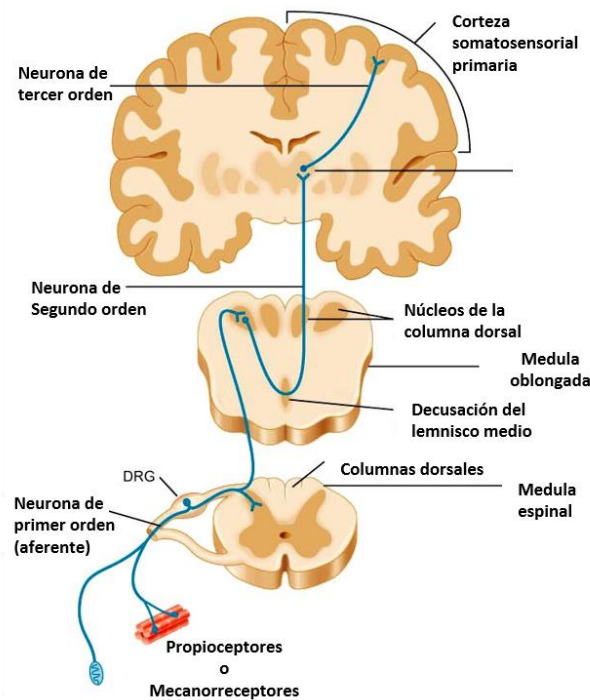


Figura 4. Las neuronas de primer orden viajan desde el receptor sensorial en la periferia, hacia la médula espinal, y luego viajan hacia arriba por el cordón en las columnas posteriores (fascículo gracilis y cuneatus) para sincronizar las neuronas de segundo orden en el núcleo gracilis y núcleo cuneatus ubicados en la médula (ver figura arriba). Los axones de estas neuronas de segundo orden se decusan como fibras arqueadas internas y luego forman el lemnisco medio en el otro lado de la médula. La siguiente sinapsis importante ocurre cuando los axones del lemnisco medial terminan en el núcleo lateral posterior ventral (VPL) del tálamo. Las neuronas de VPL luego se proyectan a través de la extremidad posterior de la cápsula interna en las radiaciones somatosensoriales talámicas para alcanzar la corteza somatosensorial primaria en el giro poscentral [©Pearson Education 2011].

3.2 Áreas del cerebro

Para obtener información sobre las áreas del cerebro involucradas en el comportamiento sexual, se realizan principalmente estudios de lesiones, estimulación y registro electrofisiológicos, microdiálisis, estudios farmacológicos y registro de la actividad celular. El MPOA es una estructura organizativa crucial involucrada en el comportamiento copulatorio masculino (Hull et al., 2006). En la rata, el sustrato neurofisiológico que controla el comportamiento copulatorio implica un número muy significativo de regiones cerebrales y mensajeros químicos. Se espera que las características funcionales de este sustrato se modifiquen significativamente en aquellos animales que muestran latencias de eyaculación diferentes (largas o cortas), en función del contexto en el que se produce el encuentro sexual (Snoeren et al., 2014). Coolen et al. (1998)

demonstraron que existe un subcircuito que se activa específicamente cuando las ratas macho eyaculan con una latencia disminuida, lo que nos da la oportunidad de estudiar con mayor precisión las áreas involucradas en este fenómeno. Este circuito consiste en la amígdala dorsal posterior medial lateral, la región posteromedial del núcleo del lecho de la estría terminal, el núcleo preóptico postero-dorsal y la región parvocelular del núcleo talámico subparafascicular. Dado que la mayoría de estas estructuras están conectadas recíprocamente con el MPOA, que sirve como centro de integración y facilitación de las respuestas reflejas genitales (Dominguez & Hull, 2005), se cree que el MPOA activa el subcircuito de la eyaculación (mostrada anteriormente en la figura 3).

Los estudios en roedores enfatizan la importancia de la amígdala corticomediale en la actividad sexual masculina. Las estructuras amígdaloideas son puntos nodales clave para la integración de los estímulos quimiosensoriales, somatosensoriales y hormonales a través de los bulbos olfativos principales y accesorios a través del núcleo talámico subparafascicular (Hull & Dominguez, 2007; Snoeren et al., 2014). En particular, la amígdala medial (MeA) transmite estímulos quimiosensoriales desde los bulbos olfativos a los núcleos de la línea media del área preóptica. Las señales quimiosensoriales se proyectan desde los bulbos olfatorios a los núcleos amígdaloideos medial y cortical (anterior, postero-lateral y medial) a través del tracto olfativo lateral (Hull & Dominguez, 2007). Las proyecciones del bulbo olfativo accesorio apuntan a los núcleos medial y posteromedial, mientras que los bulbos olfativos principales se proyectan a los núcleos corticales anterior y posterolateral (Figura 5; Portillo & Paredes, 2003).

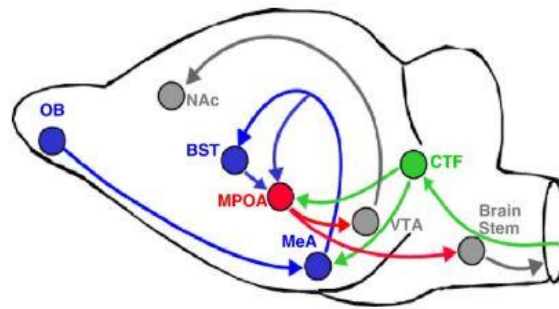


Figura 5. Circuitos neuronales que regulan el comportamiento sexual masculino. El área preóptica medial (MPOA) recibe información directa e indirecta de las áreas del cerebro que son importantes para la asimilación de información sexualmente relevante. La estimulación olfativa es recibida por los bulbos olfatorios (OB), los OB proyectan a la amígdala medial (MeA), que transmite información al núcleo del lecho de la estría terminal (BST) y al MPOA. Además, el MPOA y el MeA reciben información somatosensorial a través del campo tegmental central (CTF). A su vez, el MPOA se proyecta hacia el área tegmental ventral (VTA) y el tronco encefálico (BS). [Figura de Hull & Dominguez, 2006, con permiso de Elsevier].

3.3 Neurotransmisores y hormonas

Como se mencionó anteriormente, el reflejo de eyaculación (incluida la latencia) se controla mediante un circuito formado por el subcircuito de eyaculación (ejsc) y el MPOA (Coolen et al., 2004; deGroat & Booth, 1980; Robaire, Hinton, & Orgebin-Crist, 2006; Veening & Coolen, 2014), que están mutuamente conectados. En este punto de vista, el ejsc implica una interacción multifacética entre las neuronas serotoninérgicas centrales y dopaminérgicas con conexiones secundarias de neuronas colinérgicas, adrenérgicas, nitrérgicas, oxitocinérgicas, galanérgicas y GABAérgicas que proyectan información sensorial al MPOA y el núcleo paragigantocelularis (nPGi; (Yells, Hendricks, & Prendergast, 1992). La desinhibición del nPGi por el MPOA facilita el reflejo de la eyaculación (figura 6; Cazala et al., 2015; Dominguez & Hull, 2005; Georgiadis & Holstege, 2005), por otro lado, las vías serotoninérgicas que descienden del nPGi al núcleo lumbosacro inhiben la eyaculación. Las neuronas espinotalámicas lumbares (células LSt) son esenciales en la generación de la eyaculación (Coolen et al., 2004; Snoeren et al., 2014). Estas células envían proyecciones provenientes de la pelvis a las neuronas autónomas

(sistema simpático toracolumbar y parasimpático sacro) y motoneuronas relacionadas con la fase de emisión y expulsión de la eyaculación (Coolen et al., 2004; Truitt & Coolen, 2002).

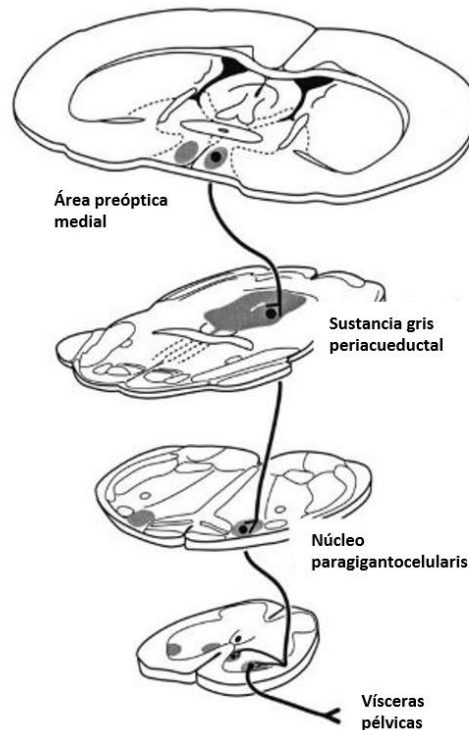


Figura 6. Figura que muestra el circuito de la médula espinal MPOA-PAG-nPGi. Las proyecciones del MPOA en el gris periacueductal (PAG) terminan entre las neuronas PAG que se proyectan hacia el núcleo paragigantocelular (nPGi). Las proyecciones descendentes del nPGi terminan dentro de las piscinas motoras dorsales y dorsolaterales de la asta ventral de la médula espinal lumbosacra. Las motoneuronas de estas piscinas inervan los músculos bulbocavernoso e isquiocavernoso, que son esenciales para la erección y la eyaculación del pene [Figura de Murphy & Hoffman, 2001].

El glutamato es liberado por las conexiones aferentes del subcircuito eyaculatorio, y junto con el óxido nítrico secretado por las neuronas dopaminérgicas y GABAérgicas (Leranth et al., 1988) conduce a la secreción de dopamina (Day, Blessing, & Willoughby, 1980). La inhibición de la dopamina y la transmisión GABAérgica (Leranth et al., 1988) en el MPOA activan las interneuronas a través de los receptores D2 para facilitar la eyaculación. La sincronización de la eyaculación depende posteriormente de los niveles de dopamina extracelulares necesarios para bloquear el tono inhibitorio.

Es ampliamente documentado que el comportamiento sexual masculino depende en gran medida de la testosterona (T) de andrógenos y sus metabolitos (Hull, Meisel, & Sachs, 2002; Hull et al., 2006). Aunque la T se produce principalmente en los testículos, las glándulas suprarrenales también producen una pequeña cantidad. Las hormonas esteroides, en particular la T, el estradiol (E2) y la dihidrotestosterona (DHT) mantienen el comportamiento de la conducta copulatoria (Hull et al., 2006). Aunque el comportamiento sexual depende de la T, se ha demostrado que no existen diferencias en los niveles sanguíneos de este andrógeno entre los animales que pueden mostrar un comportamiento sexual normal (machos copuladores) y aquellos que no pueden hacerlo (machos no copuladores) (Ågmo, 1999; 2011; Alexander et al., 1993). La aromatasa es responsable de la aromatización de los andrógenos en estrógenos. Esta enzima se puede encontrar en muchos tejidos diferentes, por ejemplo, gónadas, cerebro y tejido adiposo (Blakemore y Naftolin, 2016). En el cerebro, la aromatasa está presente principalmente en estructuras preópticas, hipotalámicas y límbicas (Roselli & Klosterman, 1998). La aromatización en el MPOA es necesaria para que la testosterona se transforme en E₂, lo que estimula el comportamiento sexual masculino (Portillo et al., 2006).

3.4 Serotonina y sistema serotoninérgico (para una descripción más detallada, ver Olivier et al., 2019)

La serotonina al inicio de la tesis nunca usas 5-HT hay que ser consistente (5-hidroxitriptamina, 5-HT) es un neurotransmisor que modula varias funciones cerebrales y fisiológicas superiores, como el estado de ánimo, la ansiedad, el estrés, la agresión, la alimentación, la cognición y el comportamiento sexual (Olivier, 2015). Este neurotransmisor está ampliamente distribuido en el cerebro (Steinbusch, 1981), aunque su contenido en el sistema nervioso central no supera el 5% total del cuerpo (Jacobs & Azmitia, 1992). Un número elevado o proyecciones serotoninérgicas en estructuras cerebrales como la corteza prefrontal y el hipocampo son especialmente importantes y están muy involucrados en el aprendizaje, los procesos de

memoria, la navegación espacial, la toma de decisiones, las relaciones sociales, la memoria de trabajo y la atención entre otros (Boureau & Dayan, 2011; Charnay et al., 2010; Štrac, Pivac, & Mück-Šeler, 2016). Pero la serotonina también está involucrada en la expresión del comportamiento sexual. Los principales grupos de células 5-HT en el cerebro anterior son el núcleo dorsal de Raphé (DRN) y el núcleo mediano de Raphé (MRN), que consisten en grupos densos de cuerpos de células 5-HT, mientras que la médula espinal y el cerebro posterior están principalmente inervados por el núcleo caudado del Raphé (Raphé Magnus, Raphé obscurus y Núcleos de Raphé pallidus) (Charnay et al., 2010). Estas proyecciones serotoninérgicas en el cerebro anterior y la médula espinal son muy importantes para la regulación de la conducta sexual (Snoeren et al., 2014). El sistema serotoninérgico contiene al menos 14 clases diferentes de receptores de serotonina (5-HT_{1A}, 1B, 1D, 1E, 1F, 2A, 2B, 2C, 3, 4, 5A, 5B, 6 y 7) y un transportador de serotonina (SERT). Con la excepción del receptor 5-HT₃, un canal iónico permeable a los cationes, todos los receptores 5-HT están acoplados a la proteína G (Olivier, 2015). La serotonina participa en la inhibición y desinhibición requeridas para inducir el comportamiento sexual y debido a este comportamiento sólo debe ocurrir en circunstancias adecuadas, por lo tanto, está bajo inhibición constante (Hull, Muschamp, & Sato, 2004). La liberación de 5-HT se regula mediante un mecanismo de retroalimentación negativa (Gothert & Weinheimer, 2004) efectuado por diferentes autorreceptores presinápticos 5-HT (5-HT_{1A} y 5-HT_{1B}). En particular, los receptores 5-HT_{1A}, localizados en el soma y las dendritas de las neuronas 5-HT, abren los canales de potasio mediante el acoplamiento de la proteína G que, al activarse, inhiben la activación de las células 5-HT y, posteriormente, la liberación de 5-HT (Olivier, 2015). Otros receptores 5-HT que podrían estar implicados en los mecanismos de retroalimentación de 5-HT son los subtipos de receptores 5-HT_{1B}, 5-HT₄ y 5-HT₇, pero los mecanismos de los sistemas de retroalimentación postsinápticos son complejos y solo se entienden parcialmente, debido a sus efectos indirectos. Un mecanismo importante involucrado en el mantenimiento de los niveles

de 5-HT es el SERT, responsable del transporte activo de la serotonina a las neuronas después de su liberación. Los SERT se encuentran en las membranas presinápticas de las terminales nerviosas y en los cenotes dendríticos de las células serotoninérgicas, y su función es mediar en la eliminación y el reciclaje de la 5-HT liberada para mantener la homeostasis del sistema serotoninérgico (Murphy et al.,2004). Una vez en la neurona, la 5-HT puede almacenarse en vesículas para una futura liberación o será degradada por la monoaminoxidasa (MAO) en 5-hidroxi-3-indolacetaldehído (5-HIAL) y posteriormente se procesará en ácido 5-hidroxi-3-indolacético (5-HIAA; Bortolato, Chen, & Shih, 2010, figura. 7)

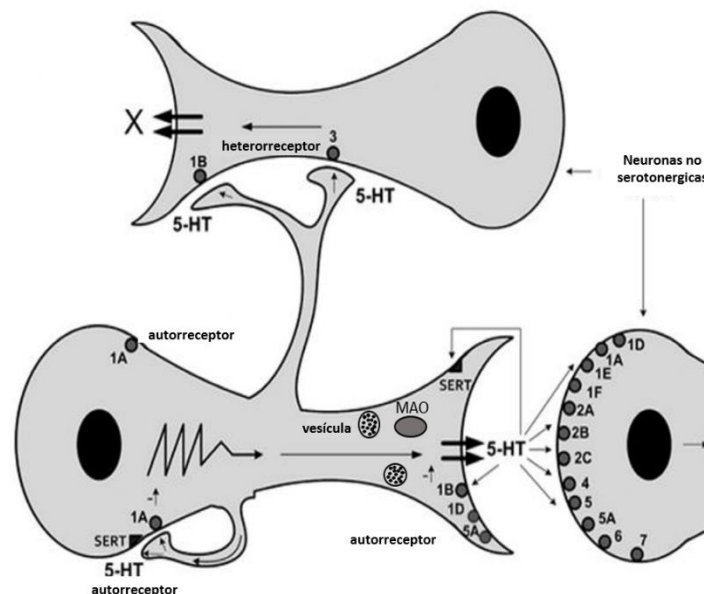


Figura 7. Dibujo que muestra el sistema de serotonina (5-HT) con la ubicación del transportador de serotonina (SERT) y los subtipos de receptores 5-HT $1A$, $1B$, $1D$, $1E$, $1F$, $2A$, $2B$, $2C$, 4 , 5 , $5A$, 6 y 7 en las neuronas pre y postsinápticas y su efecto sobre la serotonina. Las vesículas de 5-HT liberan el neurotransmisor a la hendidura sináptica, donde se une a los receptores o es reabsorbido por el SERT para su posterior recaptación en las vesículas y degradación por la MAO en las mitocondrias [Imagen modificada de Snoeren et al., 2014, con permiso de Elsevier].

En general, se supone que la activación serotoninérgica está involucrada en la actividad sexual masculina. El papel del sistema serotoninérgico en las disfunciones de la eyaculación, como la PE o la eyaculación retardada, se ha sugerido a través de la hiposensibilidad del $5-HT_{2C}$ o la

hipersensibilidad de los receptores 5-HT_{1A} (Waldinger, 2002; Waldinger et al., 1998). Los varones con baja neurotransmisión de serotonina e hiposensibilidad del receptor 5-HT_{2C} pueden tener un umbral de eyaculación en un punto de ajuste inferior y eyacular rápidamente con una estimulación leve; por el contrario, los hombres con un punto de ajuste más alto pueden tener una latencia prolongada y necesitar niveles más altos de estimulación sexual para proporcionar un mayor control sobre su eyaculación. En el otro extremo, los hombres con un punto de ajuste muy alto pueden experimentar una eyaculación retardada independientemente de que logren una erección completa después de la estimulación sexual adecuada. La administración de los ISRS un par de horas antes del coito puede ser eficaz y bien tolerada (Jannini & Lenzi, 2005; Waldinger , 2007) pero a menudo se asocia con un menor retraso en la eyaculación que con el tratamiento crónico diario, lo que lo hace más adecuado para hombres con un grado más leve de PE. La administración crónica de ISRS se relaciona con un mayor tiempo de eyaculación retardada principalmente a través de la mejora de la neurotransmisión 5-HT que se sugiere como resultado de la desensibilización de los receptores presinápticos 5-HT_{1A} y 5-HT_{1B} /_{1D} (Waldinger, 1998). Los tratamientos a pedido deben comenzar con un ensayo diario inicial o un tratamiento con dosis bajas diarias de ISRS (Kim & Paick, 1999; McMahon & Touma, 1999; Rowland et al., 2000).

Cuando los inhibidores de la recaptación de 5-HT se administran crónicamente en roedores, el umbral de la eyaculación puede aumentar; la frecuencia de eyaculación disminuye, mientras que el número de montas e intromisiones aumentan (Olivier et al., 2006). En 2006, se generaron ratas noqueadas al transportador de serotonina (SERT; Smits et al., 2006) que ofrecieron la posibilidad de estudiar el comportamiento sexual basal y el estado funcional del receptor 5-HT_{1A} en ratas que carecen de la SERT. Chan et al. (2011) utilizaron ratas homocigotas (SERT^{-/-}), heterocigotas (SERT^{+/-}) y de tipo salvaje (SERT^{+/+}) para investigar los efectos de los niveles de 5-HT extracelulares elevados en el cerebro debido a la falta del SERT. Los autores también

utilizaron estos animales para investigar el efecto del agonista del receptor 5-HT_{1A} 8-OH-2- (di-n-propilamino) tetralina (8-OH-DPAT) y el antagonista de 5-HT_{1A} WAY100635. En los niveles basales, estos investigadores encontraron diferencias en las frecuencias de eyaculación y latencias; las ratas SERT^{-/-} mostraron un número menor de eyaculaciones y una latencia de eyaculación más larga en comparación con las ratas SERT^{+/+}. Las ratas SERT^{+/-} y SERT^{+/+} tienen números comparables de eyaculaciones y latencias de eyaculación. Aparentemente, se necesita un cierto nivel de moléculas funcionales SERT en el cerebro para poder ejecutar un comportamiento sexual "normal" en la rata macho.

Como se mencionó anteriormente, los efectos secundarios sexuales de los ISRS se han utilizado terapéuticamente para tratar la eyaculación precoz (EP) en los hombres (Waldinger et al., 2001a; Waldinger, 1998). Los estudios que utilizaron el tiempo de latencia de la eyaculación intravaginal (IELT) demostraron efectos claros de aumento de IELT después de la administración de varios ISRS (paroxetina, sertralina y nefazodona), pero también diferencias claras entre los ISRS en el grado de inhibición (Olivier et al., 1999; Waldinger et al., 2001b). Esto podría ser indicativo de mecanismos individuales asociados en los ISRS, pero también de la influencia diferencial de varios ISRS en los mecanismos serotoninérgicos vinculados a diferentes receptores 5-HT ubicados en diferentes áreas del prosencéfalo y la médula espinal. Específicamente, los receptores 5-HT_{1A}, _{1B} y _{2C} se han implicado en el comportamiento sexual masculino. La estimulación de los receptores 5-HT_{1A} por varios agonistas tiene efectos pro sexuales en ratas (Figura 8; Snoeren et al., 2014), aunque esto es menos claro en los seres humanos, donde la bupiriona es el único agonista disponible (parcial) del receptor HT_{1A}. Los agonistas del receptor 5-HT_{1A} como 8-OH-DPAT, flesinoxan, bupiriona, ipsapiriona y otros (Olivier et al., 1999) en ratas disminuyen la latencia a la primera eyaculación y disminuyen el número de montas e intromisiones para alcanzar la eyaculación (Figura 8). En una prueba de 30 minutos, 8-OH-DPAT puede inducir hasta 5 eyaculaciones (Pattij et al., 2005). La actividad

pro sexual de los agonistas del receptor 5-HT_{1A} puede ser bloqueada por los antagonistas de este receptor, v.g. WAY100,635, que en sí misma no tiene actividad intrínseca (Figura 8; de Jong et al., 2005). Esto indica que en condiciones basales los receptores 5-HT_{1A} no juegan un papel crucial en el comportamiento sexual. Aparentemente, los receptores 5-HT_{1A} se vuelven importantes cuando son activados por los agonistas del receptor 5-HT_{1A} o en condiciones de altos niveles extracelulares de 5-HT, por ej. inducida por ISRS (Bosker, Klompmakers, & Westenberg, 1995). Agregar un antagonista del receptor 5-HT_{1A} a un ISRS (paroxetina o citalopram de administración aguda o crónica) exacerbó los efectos inhibitorios sexuales de los ISRS (Figura 8; de Jong et al., 2005). Este efecto puede estar mediado por la inhibición de los autorreceptores 5-HT_{1A} que normalmente limitan el aumento de los niveles de 5-HT, y / o por el bloqueo de los receptores postsinápticos 5-HT_{1A} que disminuyen el umbral de eyaculación (Figura 8). Se observó un efecto comparable en ratas SERT^{-/-} donde WAY100,635 disminuyó la frecuencia de eyaculación que no ocurrió en los machos SERT^{+/+} y SERT^{+/-} (Chan et al., 2011). Los receptores 5-HT_{1A} se desensibilizan en ratas SERT^{-/-}. El tratamiento con ISRS crónico también redujo el efecto pro sexual de 8-OH-DPAT (de Jong et al., 2005) lo que confirma la conclusión de que, en circunstancias normales, los niveles de 5-HT no son lo suficientemente altos (tono endógeno bajo) para inducir un efecto mediado por el receptor 5-HT_{1A} sobre el comportamiento sexual masculino. Bajo un tono endógeno alto (por ejemplo, después de los ISRS), el papel de los receptores 5-HT_{1A} se vuelve importante. Tanto los autorreceptores 5-HT como los receptores postsinápticos 5-HT_{1A} están involucrados en varios aspectos del comportamiento sexual (Snoeren et al., 2014). Los receptores postsinápticos 5-HT_{1A} están presentes en muchas áreas del cerebro y la médula espinal, en línea con la participación de diferentes áreas del cerebro en diferentes aspectos del comportamiento sexual (Snoeren et al., 2014; Uphouse & Guptarak, 2010). Aunque la administración aguda de los agonistas del receptor 5-HT_{1A} facilita el comportamiento sexual masculino (Figura 8; Olivier

et al., 2011; Snoeren et al., 2014), la administración crónica (por ejemplo, buspirona y flesinoxan) conduce a efectos disminuidos, aunque la actividad sexual permanece presente. Esto aparece en línea con los hallazgos humanos con buspirona y vilazodona que reportan menores o ningún trastorno sexual después de la administración crónica (Bijlsma et al., 2014). El resultado conductual resultante (facilitación de la conducta sexual masculina) es bastante difícil de explicar por este complejo mecanismo que subyace a la activación de todos los receptores 5-HT_{1A} (Snoeren et al., 2014). Para explorar más a fondo el papel de los receptores 5-HT_{1A} pre y postsinápticos en el comportamiento sexual masculino, los agonistas del receptor 5-HT_{1A} de alta afinidad desarrollados recientemente pueden ser de gran utilidad. Estos llamados agonistas selectivos y de alta afinidad (Garcia-Garcia, Newman-Tancredi, & Leonardo, 2014; Adrian Newman-Tancredi, 2011) muestran selectividad para los receptores 5-HT_{1A} pre- o postsinápticos. Ese es el caso de F15599, un agonista selectivo de alta afinidad del receptor 5-HT_{1A} (K_i = 3.4 nM) para los heterorreceptores 5-HT_{1A} postsinápticos, y para F13714 (K_i = 0.1 nM), un agonista autorreceptor preferencial 5-HT_{1A} (de Boer & Newman-Tancredi, 2016; Hazari et al., 2017; Koek et al., 2001). Otro ligando con alta afinidad (K_i = 1.8 nM) para los receptores 5-HT_{1A} es S-15535, que actúa *in vivo* como agonista preferencial en los autorreceptores presinápticos y como antagonista en los heterorreceptores 5-HT_{1A} postsinápticos (Carli et al., 1999; Millan et al., 1993). Estos compuestos no se han utilizado hasta el momento para estudiar el comportamiento sexual masculino, pero pueden arrojar más luz sobre el complejo papel de los receptores 5-HT_{1A} en el comportamiento sexual de ratas macho.

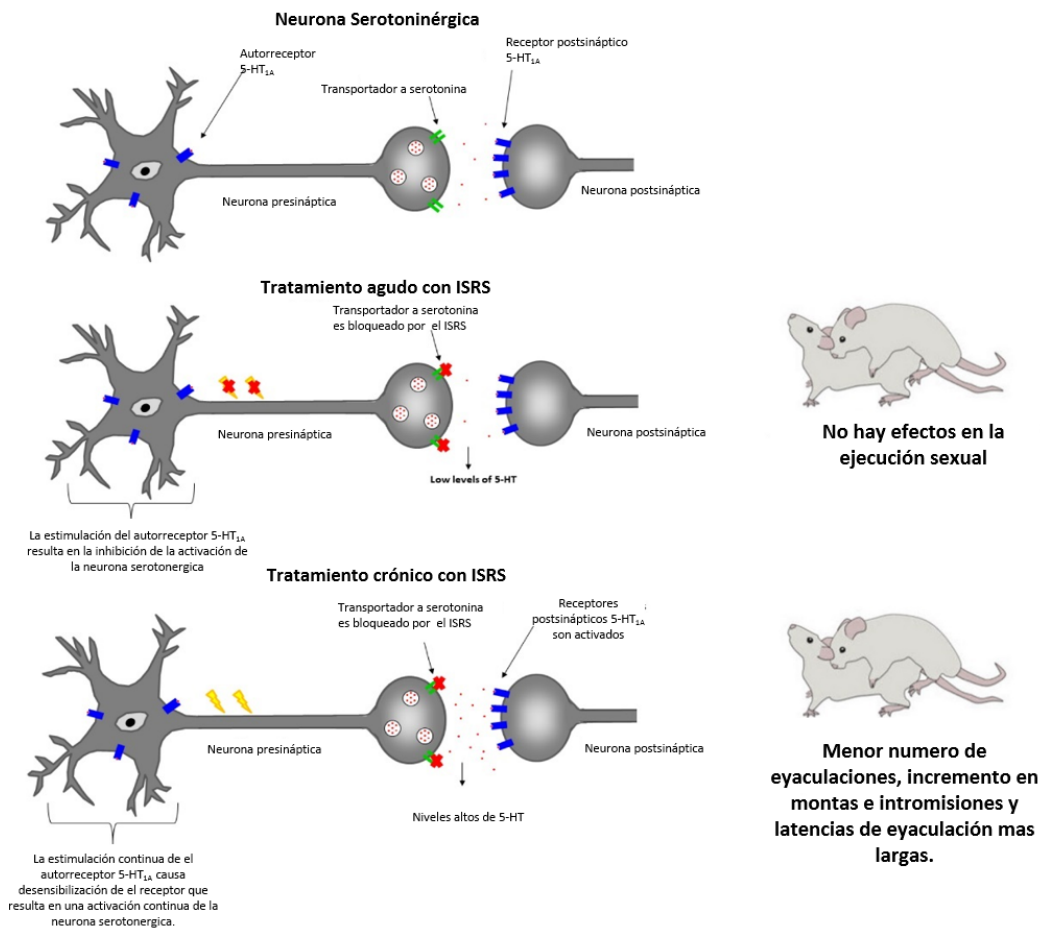


Figura 8. Representación de la transmisión serotonérgica y el rendimiento sexual en una neurona serotonérgica. El efecto sobre el comportamiento sexual se muestra cuando: se administran tratamiento agudo con ISRS, tratamiento crónico con ISRS, tratamiento agonista agudo del receptor 5-HT_{1A}, tratamiento agudo con antagonista del receptor 5-HT_{1A} y tratamiento agudo con ISRS combinado con antagonista del receptor 5-HT_{1A}. Lo que de nueva cuenta reafirma la importancia del sistema serotonérgico (SERT y el receptor 5-HT_{1A}) así como la disponibilidad de 5-HT en la hendidura sináptica para la regulación de la conducta sexual.

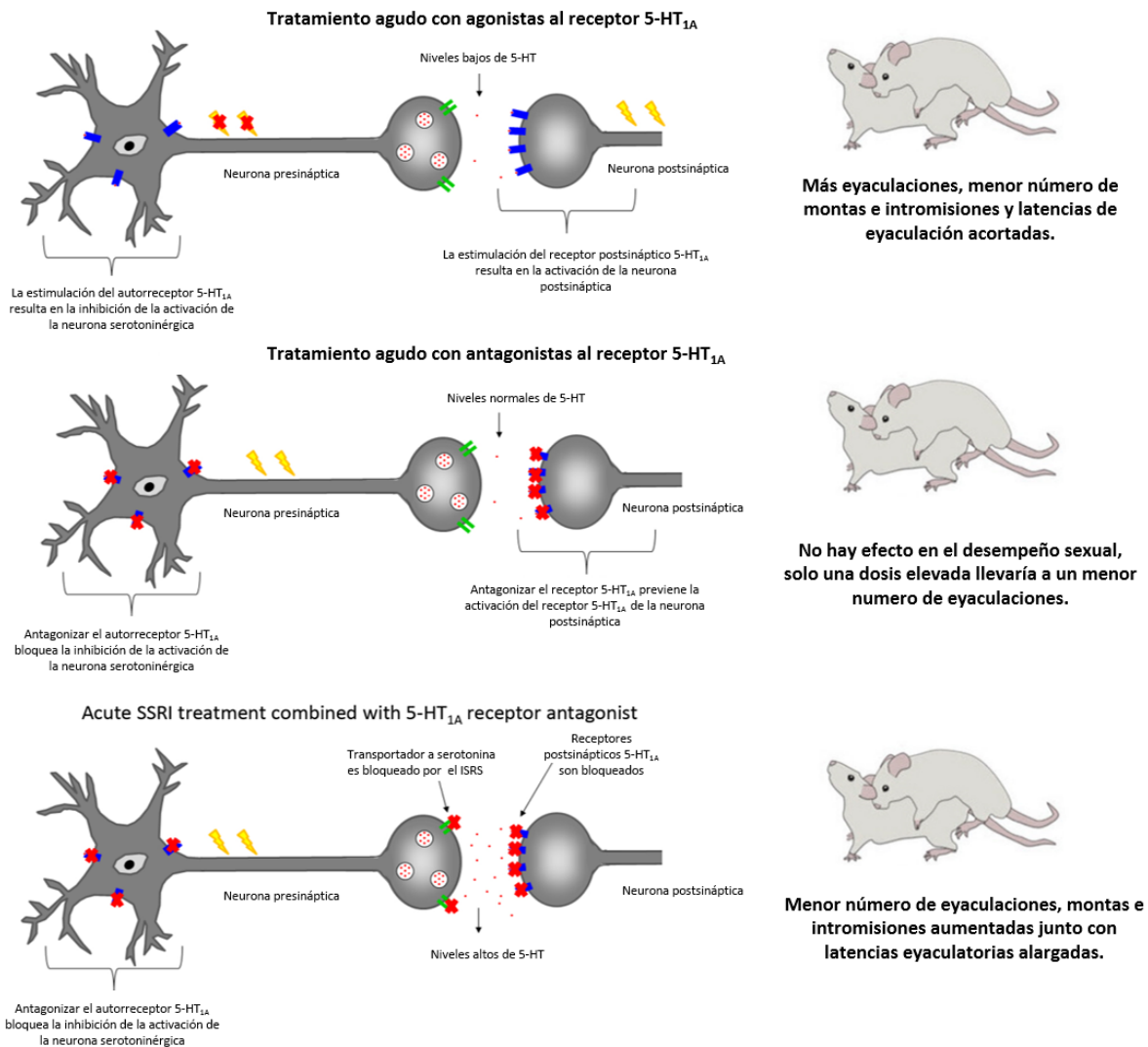


Figura 8. Continuación.

4. Objetivo y esquema de la tesis.

Hasta ahora, la comunidad científica ha reunido pruebas suficientes para identificar parte de los orígenes de los trastornos de la eyaculación precoz y tardía, pero el hecho de que los tratamientos propuestos no sean 100% efectivos, sugiere que el modelo requiere alcanzar una comprensión completa de estos. Por lo tanto, el objetivo general de esta tesis fue investigar otros mecanismos implicados en la expresión de la disfunción sexual de la eyaculación. Específicamente, nosotros 1) evaluamos el papel de la corteza somatosensorial en la expresión del comportamiento copulatorio; 2) estudiamos el papel del transportador de serotonina (SERT)

en el rendimiento sexual mediante el uso de la rata SERT noqueada, un modelo animal que se asemeja a la disfunción sexual crónica inducida por ISRS en humanos; 3) estudiamos el efecto a demanda del tramadol en animales de la cepa Wistar de tipo wildtype y en ratas SERT^{+/+}, SERT^{+/-} y SERT^{-/-} Wistar; y 4) evaluamos el papel de los agonistas preferenciales al receptor 5-HT_{1A} pre- y post-sinápticos en la expresión de la función sexual en ratas SERT^{+/+} y en las ratas SERT^{-/-}.

Esta tesis se divide en dos partes principales. La primera contiene los **capítulos 1- 3** y se refiere a la descripción de los modelos disponibles para comprender la eyaculación precoz.

El **capítulo 1** ofrece una descripción general introductoria del modelo anatómico actual para comprender la neurobiología de la regulación de la conducta sexual, centrándose especialmente en la eyaculación precoz, prestando especial atención al papel del sistema serotoninérgico y del transportador de serotonina en la función sexual.

En el **capítulo 2**, basado en el concepto de que el tamaño relativo de las representaciones corporales en la corteza somatosensorial primaria se correlaciona positivamente con la importancia funcional (habilidades motoras) del segmento corporal implícito, exploramos la relación entre el desempeño sexual y el tamaño relativo de la representación genital en la corteza somatosensorial S1.

Para estudiar el comportamiento sexual y comprender los mecanismos detrás de él, la necesidad de modelos animales adecuados que puedan imitar el comportamiento humano se ha convertido en una cuestión de gran importancia. El modelo de rata noqueada del transportador de serotonina se ha caracterizado previamente y se han descrito las consecuencias funcionales de las perturbaciones del sistema serotoninérgico en paradigmas de comportamiento. En el **capítulo 3**, describimos con más detalle las diferencias en el rendimiento sexual de los animales que carecen total o parcialmente del transportador de serotonina y lo establecemos como el

modelo animal utilizado para la mayoría de nuestros experimentos farmacológicos, utilizando animales de tipo silvestre con rendimiento sexual normal o alto para buscar nuevas terapias farmacológicas para la eyaculación precoz. Además, los animales con transportadores de serotonina modificados genéticamente se utilizaron para obtener una mayor comprensión de los posibles mecanismos de acción en la disfunción sexual.

La segunda parte contiene los **capítulos 4- 7**, se centran en posibles nuevos tratamientos “a demanda” de eyaculación precoz y tardía, así como sus mecanismos de acción. Hoy en día, los tratamientos más comunes y exitosos utilizados para estas disfunciones son los medicamentos cuyo objetivo principal son los diversos receptores 5-HT y el SERT. Aunque estos medicamentos han demostrado modificar significativamente la neurotransmisión de 5-HT cuando se administran de manera crónica, pueden desarrollarse efectos opuestos a los esperados, lo que lleva a dificultades para lograr la eyaculación y al incumplimiento del tratamiento. Por lo tanto, la búsqueda de tratamiento a pedido se ha convertido en un tema importante.

En el **capítulo 4**, probamos los efectos del tramadol (un opioide con propiedades ISRS que se usa comúnmente como analgésico) en animales wildtype, como un posible tratamiento agudo de la eyaculación precoz, investigando a su vez si su mecanismo de acción prevalente se debe principalmente a sus propiedades como ISRS o a otros mecanismos (como agonista del receptor μ -opioide y como inhibidor de la recaptura de norepinefrina)

En el **capítulo 5**, realizamos una serie de experimentos que investigaron más a fondo si el efecto agudo de tramadol sobre el comportamiento sexual está relacionado solo con sus propiedades SSRI y no está limitado a sus propiedades antagonistas de los receptores μ -opioides o receptores de norepinefrina. Con este fin, también probamos el tramadol en ratas SERT^{-/-}. Los resultados son complejos e ilustran el valor agregado que poseen las ratas modificadas genéticamente (en

este caso, el SERT^{-/-}) para lograr entender los mecanismos de acción de los fármacos complejos, como el tramadol.

En el **capítulo 6**, el papel de los receptores 5-HT_{1A} en la expresión de la conducta sexual se investiga más a fondo mediante el uso de varios agonistas del receptor, incluidos los diferentes agonistas preferenciales del receptor 5-HT_{1A} (F15599, F13714 y S15535), en ratas SERT noqueadas y silvestres. Los agonistas del receptor 5-HT_{1A} tienen efectos pro sexuales en ratas macho, pero aún no está claro si están involucrados los receptores 5-HT_{1A} pre o postsinápticos o ambos. Los estudios realizados en este capítulo apuntaron a desentrañar el mecanismo de acción subyacente de la actividad pro sexual de los agonistas del receptor 5-HT_{1A}.

Finalmente, en el **capítulo 7** se resumen y discuten todos nuestros hallazgos, en línea con la idea de que una combinación de tratamientos psicosexuales (no investigados en esta tesis) y farmacológicos parece necesaria para inducir y mantener la mejora del control sobre la eyaculación.

Capítulo 2

¿La latencia de la eyaculación está relacionada con el tamaño de la representación cortical genital?

Esquivel-Franco, D.C.^{1,2,3}, Gómez-Chavarrín, M.³, Olivier, B.^{1,4,5}, Olivier, J.D.A.¹ y Gutiérrez-Ospina, G.^{2*}

1. Groningen Institute for Evolutionary Life Sciences (GELIFES), Neurobiology, University of Groningen, Groningen, the Netherlands
2. Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.
3. Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB). Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.
4. Dept. of Psychopharmacology, Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences, Science Faculty, Utrecht University, Utrecht, the Netherlands
5. Department of Psychiatry, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA

Manuscrito en preparación

Resumen

En los mamíferos, el comportamiento copulador masculino está lejos de ser estereotipado. En ratas macho, por ejemplo, se pueden identificar fenotipos no copuladores y copuladores. Además, las ratas macho que muestran un comportamiento copulador pueden tener latencias eyaculatorias cortas, normales o largas. Incluso hay fenotipos que presentan montas vigorosas e intromisiones, pero no la eyaculación. Aunque todas estas categorías masculinas pueden ser el resultado de diferencias interindividuales en la disponibilidad de neurotransmisores, receptores de esteroides sexuales y actividad de la enzima aromatasa en regiones cerebrales específicas, también se ha demostrado que pueden reflejar diferencias en las funciones sensoriales como las observadas en el sistema olfativo de ratas machos copuladoras y no copuladoras. Sin embargo, la respuesta sexual masculina depende no solo de los estímulos olfativos sino también de la estimulación somatosensorial adecuada de los genitales y del resto del cuerpo. Por lo tanto, las diferencias en el comportamiento copulatorio masculino también podrían ser el resultado de distinciones anatómicas y funcionales individuales a lo largo de las vías somatosensoriales. Con este fin, estudiamos una posible relación entre el tamaño de la representación genital en la corteza somatosensorial primaria (S1) y la expresión individual del comportamiento copulatorio en ratas macho. Presumimos que los machos que presentan patrones copulatorios y latencias de eyaculación cortas tendrían una mayor representación del área genital en S1. En línea con estas expectativas, nuestros resultados preliminares muestran que los machos que tienen latencias de eyaculación cortas (<600 s) e intermedias (601-1200) tienen representaciones genitales más grandes en S1 que los que tienen latencias de eyaculación largas (1201-1800). Además, los animales no copuladores tuvieron las representaciones genitales más pequeñas en S1. Se observó una correlación inversa entre el área de la representación cortical genital y las latencias de eyaculación entre los grupos de ratas macho estudiadas, lo que respalda que cuanto mejor sea el rendimiento, mayor será la representación genital S1.

Palabras clave: Comportamiento sexual, eyaculación, corteza somatosensorial, genital.

1. Introducción

El comportamiento copulatorio se ha considerado un conjunto de patrones motores generalizados (Dewsbury et al., 1979; Dewsbury & Hartung, 1980). Sin embargo, este punto de vista ha sido cuestionado por la evidencia en varias especies de mamíferos de que los machos en realidad tienen diferentes categorías copulatorias (Alexander et al., 1993; Alexander et al., 1999; Antaramian et al., 2015; De Gasperín-Estrada, Camacho, & Paredes, 2008; Larsson, 1961; Pattij et al., 2005; Portillo et al., 2013; 2006a; 2006b). Si bien estas categorías podrían resultar de la presión ecológica (por ejemplo, estado social, estrategias reproductivas, organización social reproductiva; Lucio et al., 2012) y, por lo tanto, ser susceptibles de modificación por información ambiental y / o experiencia sexual y reproductiva, también podrían ser inmutable y resultado de diferencias morfofuncionales interindividuales. En particular, las ratas macho ejercen un comportamiento copulatorio variable; pueden copular o no (K. Larsson, 1961). Si los machos copulan con hembras receptivas, pueden mostrar un número mayor o menor de eyaculaciones en un período de prueba experimental (por ejemplo, 1800) y pueden clasificarse como latencias eyaculatorias cortas (247 ± 45 s), intermedias (717 ± 133 s) o largas (1697 ± 80 s) (Pattij et al., 2005) Habiendo así también machos que a pesar de desplegar los patrones motores de copula, no logran alcanzar la eyaculación (no eyaculadores) y aquellos machos que aun en presencia de una hembra receptiva no despliegan ninguna conducta copulatoria durante las series de entrenamientos (no copuladores). Debido a que el desempeño de los machos en diferentes categorías muestra consistencia, las categorías copuladoras masculinas podrían ser características biológicas relativamente intrínsecas e inmutables (Pattij et al., 2005). En apoyo a esta suposición, las ratas copuladoras tienen niveles más altos de serotonina en el núcleo paragigantocelular ubicado en la región lumbar de la médula espinal y en el área hipotalámica lateral (revisado en de Jong et al., 2006), una mayor

disponibilidad de dopamina en el área preóptica medial del hipotálamo (MPOA, Dominguez & Hull, 2005), una proporción reducida de células inmunorreactivas a receptores de andrógenos (AR) en la amígdala postero-dorsal (MePD) y una menor proporción de neuronas inmunorreactivas a receptores α estrogénicos (α ER) en el núcleo dorsal anterior de la amígdala medial (MeAD; Hull & Dominguez, 2007). Otras observaciones en ratas copuladoras vs ratas no copuladoras incluyen un mayor número de neuronas α ER inmunopositivas en el MPOA, una mayor actividad de la enzima aromatasa en el núcleo preóptico medial (MPN; Portillo et al., 2007; 2006) y un aumento en el reclutamiento neuronal para olores sexualmente relevantes en el núcleo del lecho de la estría terminal (BNST) y el MPOA (Portillo et al., 2013).

Sin embargo, el comportamiento sexual depende no solo de las acciones tradicionalmente estudiadas de las estructuras neuronales relacionadas con la motivación y la implementación del comportamiento sexual y reproductivo, sino también de las contribuciones de las estructuras neuronales responsables del procesamiento de la información sensorial (Georgiadis, 2012; Georgiadis & Holstege, 2005; Ruytjens et al., 2007). En apoyo a este último punto de vista, Portillo et al. (2013) informaron un aumento en el reclutamiento neuronal en el bulbo olfatorio accesorio (AOB) de ratones copuladores en respuesta a olores sexuales relevantes. Contreras y Ågmo (1993) mostraron que anestesiarse y desnervarse el pene altera la expresión de los patrones motores copuladores. En particular, las ratas con anestesia en la región del surco balano-prepucial (BPG) mostraron una disminución en el número de montas e intromisiones; aquellos con denervación en la rama dorsal del nervio pudendo mostraron menos montas e intromisiones, y aquellos que estaban anestesiados y denervados pudieron montar, pero no mostraron el patrón de intromisión cuando se emparejaron con hembras receptivas. Ninguno de los sujetos en estos tres grupos experimentales eyaculó. Datos recientes han demostrado que la

información mecanosensorial de los órganos sexuales masculinos externos, además de contribuir a la expresión del comportamiento copulatorio masculino, permite la organización de los patrones motores subyacentes al comportamiento copulatorio (Pavlou et al., 2016). Por lo tanto, las diferencias en la expresión de los patrones motores copuladores observados entre las diferentes categorías de ratas macho también podrían reflejar diferencias en la morfofisiología del sistema somatosensorial asociado con los genitales externos.

La información somatosensorial generada por la estimulación mecánica de los genitales externos se envía a la corteza somatosensorial primaria (S1; Cazala et al., 2015), a través de una vía tri-sináptica que involucra la columna dorsal y el lemnisco medial. En el S1 de las ratas, la representación del cuerpo está formada por módulos citoarquitectónicos de varios tamaños, llamados barriles. El tamaño relativo de estas representaciones se correlaciona positivamente con la importancia funcional del segmento del cuerpo representado (D. Purves, 1988). Aunque todavía no se ha descrito una representación anatómica de los genitales en S1 (ver resultados a continuación), estudios electrofisiológicos recientes indican que la representación genital en la rata se encuentra en la porción ventral de la representación del tronco en la corteza somatosensorial y se extiende hasta la representación de los segmentos proximales de las extremidades anterior y posterior (Lenschow et al., 2015).

En este estudio, evaluamos la relación entre las diferentes categorías copulatorias y el tamaño de la representación genital en la corteza somatosensorial primaria en ratas. Se pronostica que diferentes categorías copulatorias muestren diferencias sistemáticas en el tamaño de la representación genital en S1. En particular, hipotetizamos lo siguiente: 1) las ratas copuladoras tienen representaciones genitales más grandes que las no copuladoras, y 2) los animales entrenados (<1200s), que muestran latencias de eyaculación cortas e

intermedias, tienen la mayor representación entre las diversas categorías copulatorias (copuladores y no copuladores).

2. Materiales y Métodos

2.1 Animales

Para la realización de este estudio se utilizan ratas macho de la cepa Wistar (n=80) de alrededor de 90 días de edad sin experiencia sexual previa. Con excepción de las ratas macho utilizadas para llevar a cabo la identificación de la representación genital cortical (n=15; obtenidas del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas), el resto de los animales provinieron de las colonias reproductivas del Bioterio del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados (CINVESTAV, sede Sur). Estos últimos machos fueron expuestos a encuentros copulatorios con hembras ovariectomizadas receptoras y su desempeño evaluado durante seis sesiones. Como resultado de ello, los machos fueron clasificados como copuladores y no copuladores. Los machos copuladores fueron sub clasificados en función de su latencia de eyaculación considerando su desempeño en las últimas 4 pruebas ya que generalmente los machos no eyaculan en el primer encuentro sexual, la mayoría lo hace a partir del segundo o tercero (Lucio y Tlachi-López, 2008). Durante todo el experimento, los machos se alojaron individualmente permitiéndoles libre acceso al alimento y al agua. Las cajas-habitación se mantuvieron en cuartos con temperatura controlada y bajo un régimen de ciclo invertido de iluminación de 12/12 horas. Las pruebas conductuales se realizaron y evaluaron durante el periodo de oscuridad de los animales y bajo iluminación de tonalidad roja. Adicionalmente a los grupos de ratas macho, también se utilizaron ratas hembra ovariectomizadas (n=65), a las cuales se les indujo la receptividad y proceptividad mediante la administración subcutánea de una dosis de 25 µg de benzoato de estradiol/rata 48 horas antes de las sesiones copulatorias y de 500 µg de

progesterona/rata 4 horas antes de las mismas. Las hembras fueron alojadas en cohortes de 10 animales por caja habitación, permitiéndoles también el acceso libre al alimento y al agua.

2.2 Ovariectomía

Para realizar la ovariectomía, cada rata hembra se anestesió con tribromoetanol (0.2g/kg) suministrado por vía intraperitoneal. Con ayuda de una rasuradora eléctrica se retiró el pelo de la región dorsolateral de ambos costados y se realizaron los procedimientos de asepsia correspondientes. Con el animal colocado en posición de decúbito lateral, se hizo una incisión de aproximadamente 0.5 cm de longitud en el flanco, se separó la piel y se hizo una segunda incisión a través del músculo alcanzando la cavidad peritoneal. Una vez en la cavidad peritoneal, se extrajo la grasa periovárica a través de la incisión, y se identificó al ovario. Posteriormente se ligó el paquete vasculo-nervioso y se separó el ovario de la grasa del cuerno uterino adyacente. Luego de realizada la ovariectomía, la herida fue cerrada conforme a los protocolos quirúrgicos recomendados. La misma operación fue ejecutada en el lado contra lateral. Debido a la ausencia de signos y síntomas claros de dolor o infección, se evitó el uso de analgésicos y antibióticos.

2.3 Encuentros copulatorios y clasificación de los machos

Las ratas macho fueron introducidas individualmente en un cilindro de observación hecho con acrílico transparente (altura 50cm y diámetro 60cm; Lucio y Tlachi-López, 2008), 5 minutos antes del inicio de cada prueba. El cilindro contaba con una cama de aserrín que se cambió después de cada sesión copulatoria para evitar que los olores del macho precedente afectaran el resultado de las pruebas. Una vez concluido el periodo de habituación, se introdujo a la hembra en la arena de cópula. Cada sesión de entrenamiento finalizó una vez alcanzada la eyaculación. En los machos que no eyacularon la sesión se concluyó transcurridos 30 minutos desde la primera intromisión. Durante el entrenamiento se registraron el número de montas (NM) y de

intromisiones (NI) y las latencias de monta (LM), intromisión (LI) y eyaculación (LE). Los machos nunca fueron expuestos a la misma hembra para evitar habituación y generar mayor motivación sexual (Olivier et al., 2017).

Con base en estas evaluaciones, los machos se clasificaron en función de la latencia de eyaculación mostrada en las últimas cuatro sesiones (ver resultados). Las categorías fueron: **1)** machos de latencia eyaculatoria corta (L.C.; n=6), **2)** de latencia eyaculatoria intermedia (L.I.; n=19), **3)** de latencia eyaculatoria larga (L.L.; n=12). Los que mostraron patrones copulatorios, pero no alcanzaron a eyacular en 30 minutos en ninguna de las seis sesiones fueron considerados como copuladores no eyaculadores (N.E. n= 9). Aquellos que no mostraron patrones motores copulatorios fueron denominados como no copuladores (N.C.; n= 19).

2.4 Mapeo de la representación genital cortical

Estimulación

Con el objeto de identificar y posteriormente medir la representación genital cortical en la S1 se utilizaron, respectivamente, 15 ratas macho sujetas a estimulación genital no antecedida por encuentros copulatorios y 65 ratas macho expuestas a sesiones copulatorias y estimuladas mecánicamente en la región genital. Los animales que solamente fueron estimulados mecánicamente se dividieron en aquellos **1)** estimulados genitualmente en libre movimiento (n=9), **2)** estimulados genitualmente bajo anestesia (n=4) o **3)** ratas no estimuladas en libre movimiento (n=2). Todas las ratas utilizadas para medir la representación cortical genital en la S1 fueron estimuladas mecánicamente en los genitales después de la última prueba copulatoria.

Los animales se estimularon con un pincel grueso de cerda (Rodin No.14, serie S-611), frotando generosamente la región genital de manera continua por 20 minutos, adaptando los lineamientos del protocolo descrito por Filipkowski et al. (2000). Finalizado el periodo de estimulación, se permitió descansar a los animales durante 40 minutos al término de los cuales se sacrificaron

mediante una dosis letal de pentobarbital sódico siguiendo la guías reportadas por Morgan & Curran (1991). Entonces, las ratas fueron perfundidas con NaCl 0.15 M (300 ml) seguido de paraformaldehído (4%; 300 ml) amortiguado (solución de fosfatos; PB; 0.1M, pH. 7.4). Los cerebros fueron retirados y sus cortezas fueron disecadas y postfijadas aplanadas entre dos portaobjetos separados por 2mm (Riddle et al., 1992), por 24 horas en el mismo fijador a 4°C. Finalizado este periodo, las cortezas se mantuvieron hasta por 72 horas en PB a 4°C.

Inmunocitoquímica para cFos

El día de los inmunomarcajes, las cortezas se cortaron (50µm) tangencialmente en un vibratomo y las rebanadas fueron recolectadas individualmente en cajas de 24 pozos con PB. Las rebanadas fueron procesadas por flotación mediante el protocolo de inmunocitoquímica para c-Fos. Para ello, las rebanadas recibieron tres lavados con PB adicionado con Tritón X-100 0.3% (PBT); cada lavado con una duración de 15 minutos. Posteriormente, las rebanadas fueron incubadas con los anticuerpos primarios obtenidos en conejo y dirigido contra c-Fos humano (Santa Cruz, 1:6000 en PBT) por 3 días a 4°C; esta proteína se expresa de manera consecutiva a la estimulación mecánica y denota activación neuronal (Filipkowski et al., 2000; Morgan & Curran, 1991). Después de tres lavados con PBT, las rebanadas fueron incubadas con anticuerpos secundarios obtenidos en burro y dirigidos contra inmunoglobulinas de conejo (Millipore 1:2500) acoplados a biotina por 90 minutos a temperatura ambiente. Las rebanadas se lavaron nuevamente (3 lavados de 15 min. cada uno) en PB e incubaron con el complejo avidina-biotina peroxidasa por 90 minutos a temperatura ambiente, en concordancia con el protocolo sugerido por el fabricante (VECTOR). Finalmente, después de tres lavados en PB, la actividad de peroxidasa en los cortes fue revelada utilizando una solución de diaminobencidina (DAB) intensificada con níquel durante aproximadamente 2 minutos a temperatura ambiente, de acuerdo con los procedimientos recomendados por el fabricante (VECTOR).

Una vez finalizado el procedimiento de inmunotinción, los cortes fueron contrateñidos mediante la histoquímica diseñada para revelar la actividad de la enzima citocromo oxidasa, que es utilizada como método de marcaje de la S1 en roedores (Wong-Riley, 1989; Hevner et al., 1995; Riddle et al., 1992). Para ello los cortes fueron incubados con una solución amortiguada de fosfatos (PB) que contenía 2,2-diaminobencidina (1.38 mM), citocromo C (12.1uM), sacarosa (116.8 mM) y catalasa (200ug/ml) por aproximadamente 3-5 horas a 37°C. Finalizado este procedimiento, los cortes fueron colocados sobre portaobjetos cubiertos con gelatina, secados al aire libre y cubiertos con medio de montaje (Cytoseal).

2.5 Análisis de Imágenes

Las laminillas fueron utilizadas para identificar al mapa corporal y la ubicación relativa de la representación genital cortical en la S1 con ayuda de un estero-microscopio de campo claro (Leica EZ4 HD). Para ello, se capturaron imágenes digitales de la zona correspondiente a la representación del tronco conservando los valores de ganancia, intensidad y brillo constantes durante las sesiones de adquisición. El área ocupada por las neuronas activadas en la zona de los genitales fue delineada siguiendo los bordes externos de la zona de activación con la ayuda del programa Image J (NIH). También se delinea la representación del tronco con el objeto de normalizar la medición del área de representación de los genitales, estimando el porcentaje que ésta ocupaba con respecto al área cortical en la S1 de la representación del tronco, ya que esta la región en donde se localizó la representación de los genitales en S1.

2.6 Estadística

Los datos de los parámetros de comportamiento no se distribuyeron normalmente y se presentan como mediana \pm IQR (rango Inter cuartil) y se analizaron mediante una prueba ANOVA Kruskal-Wallis unidireccional seguida de la prueba post-hoc de Dunn de comparaciones múltiples. Los análisis de frecuencia se utilizaron para establecer la distribución del tamaño de representación genital en S1 para la población animal como se hizo en el experimento 1. Los

análisis de correlación de Spearman se realizaron para establecer las relaciones estadísticas entre la latencia de eyaculación y el área de representación genital en S1.

3.Resultados

Existe una representación anatómica de los órganos genitales externos en la S1

Con el objeto de identificar y ubicar anatómicamente a la representación de los genitales en la S1, ratas macho anestesiadas (n=4) o no (n=9) fueron estimuladas mecánicamente en los genitales, sacrificadas y perfundidas, y sus cerebros disecados y procesados para realizar procedimientos inmunocitoquímicos para detectar cambios en la disponibilidad de c-Fos neuronal en la S1 (en función de lo publicado por Filipkowski et al., 2000). Adicionalmente, como un grupo control, se sacrificaron un par de ratas sin estimulación genital que permanecieron durante libre movimiento durante 60 minutos. La contraindicación con la técnica histoquímica para detectar la localización de la enzima citocromo oxidasa (CO) nos permitió observar al ratúnculo. Como se muestra en la figura 1, las ratas no estimuladas en libre movimiento mostraron una disponibilidad basal de c-Fos en el área correspondiente a la representación genital en la S1 (Figura 1B). La disponibilidad de c-Fos en las neuronas ubicadas en la región ventral de la representación del tronco en la S1 con relación al marcaje basal incrementó en las ratas que fueron estimuladas mecánicamente en los genitales externos en condiciones de libre movimiento (Figura 1C). En contraste, la misma región en las ratas estimuladas pero anestesiadas mostró menor presencia de células inmunopositivas para cFos (Fig. 1D).

Cinco son las categorías copulatorias identificadas en la población de machos estudiados

Con la finalidad de identificar la categoría copulatoria de cada macho de la población estudiada, se evaluó la expresión de la conducta copulatoria durante seis sesiones en presencia de hembras ovariectomizadas receptivas. Los machos se clasificaron con base su desempeño durante las cuatro últimas sesiones ya que, en general, los machos eyaculan consistentemente a partir de la segunda sesión (Lucio y Tlachi-López, 2008). Nuestros resultados muestran la existencia de cinco categorías en la población (Figura 2). Las ratas machos no copuladoras (aquellas que no mostraron ningún patrón motor de cópula) constituyeron un 29% de la población. El 71% restante fueron clasificadas como copuladoras: de latencia de eyaculación corta el 9% ($510 \pm 38s$), intermedia el 29% ($830 \pm 34s$) y larga el 18% ($1507 \pm 60s$). Los machos copuladores no eyaculadores constituyeron un 14% de la población; para que un macho pudiera ser considerado en este grupo tenía que mostrar los patrones motores de monta e intromisión, pero no eyacular en ninguna de las pruebas copulatorias. Finalmente, con excepción de la latencia de monta, no se encontraron diferencias significativas entre los fenotipos al comparar el resto de los parámetros copulatorios registrados (Figura 3), por lo que estos parámetros fueron utilizados como criterios de categorización fenotípica copulatoria.

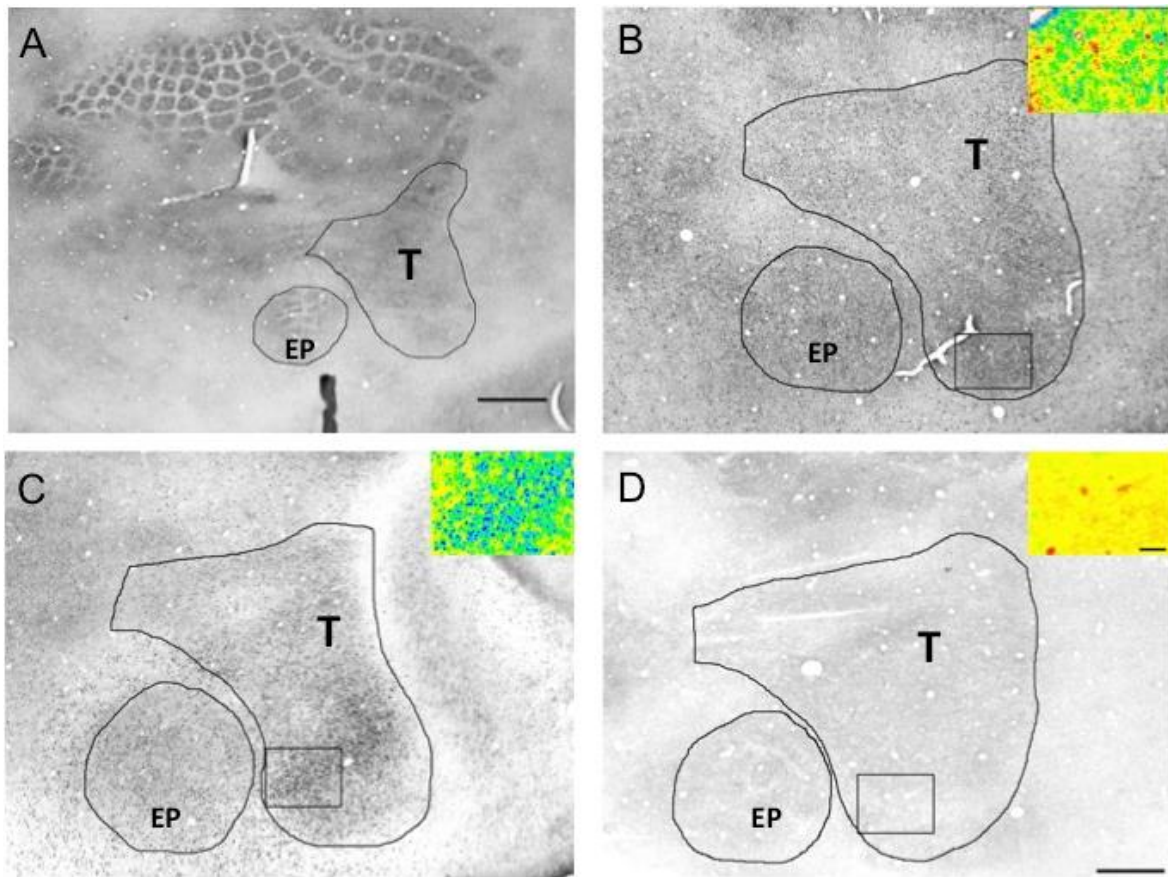


Figura 1. La representación de los genitales en S1 está contenida en el aspecto ventral de la representación del tronco en la rata macho. A. Fotomicrografía digital que muestra un corte tangencial obtenido a través de la S1 en una rata macho. Se destaca la representación del tronco (T) y la extremidad posterior (EP). Las fotomicrografías muestran magnificaciones de la representación del tronco en las ratas en libre movimiento (B), en libre movimiento sujetas a estimulación genital (C) y anestesiadas sujetas a estimulación genital (D). Los insertos en cada imagen ilustran la intensidad de la inmunomarca para cFos en las neuronas trasladadas a un código de color en la que el rojo representa la menor intensidad y el azul la mayor. Se observan delineadas las representaciones del tronco y la extremidad posterior. El recuadro indica la posición relativa de la representación genital. Escala en A: 0.5 mm; en B, C y D: 1 mm; en los insertos: 200 μ m.

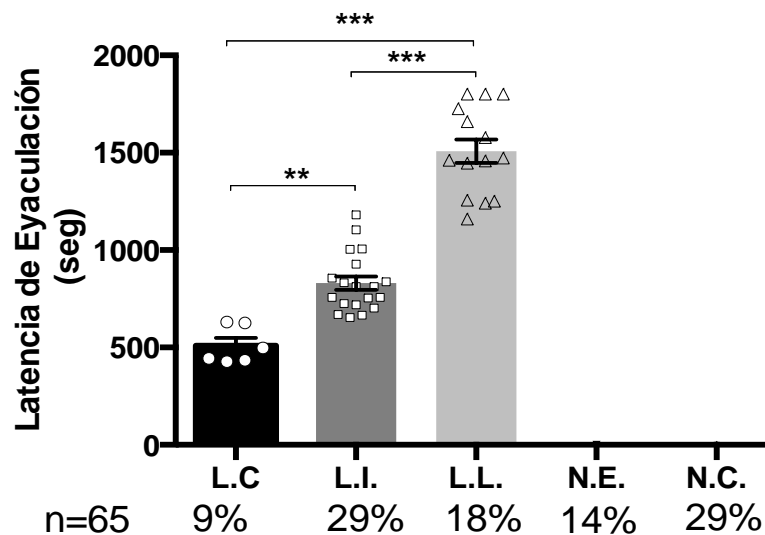


Figura 2. División en cinco categorías copulatorias en la población evaluada de ratas macho. Gráfica de barras que muestra las categorías copulatorias identificadas entre la población de ratas macho estudiadas en función de su latencia de eyacuación (Media ± Error Estándar). ANOVA Kruskal-Wallis $H_{(2,36)}=31.49$; $p < 0.001$; prueba *Post hoc* Dunn: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. L.C.: copuladores de latencia eyaculatoria corta; L.I.: copuladores de latencia eyaculatoria intermedia; L.L.: copuladores de latencia eyaculatoria lenta; N.E.: copuladores no eyaculadores; N.C.: no copuladores.

El área ocupada por neuronas activadas en la S1 en respuesta a la estimulación mecánica de los genitales externos difiere entre las ratas macho en función de su latencia de eyacuación

Con el objeto de determinar la dimensión de la representación cortical de los genitales en ratas adultas macho evaluadas y categorizadas sexualmente, y establecer la relación entre ésta con el desempeño copulatorio, los genitales de las ratas fueron estimulados mecánicamente. Concluidos los ensayos de estimulación, las ratas fueron sacrificadas y perfundidas, y sus cerebros procesados para detectar cambios en la disponibilidad de cFos en la S1 marcada con citocromo oxidasa. Como se ilustra en la figura 8, todas las ratas estimuladas mostraron núcleos inmunomarcados para cFos en la región ventral de la representación cortical del tronco en la S1, aunque la cantidad de estos núcleos y el área relativa ocupada por ellos varió en función de la categoría copulatoria a la que cada animal pertenecía (Figura 4). En términos generales los animales copuladores de latencia eyaculatoria corta e intermedia tuvieron las representaciones

genitales corticales en la S1 de mayor tamaño al ser comparados con aquellos que mostraron latencias de eyaculación larga, los no eyaculadores y los no copuladores.

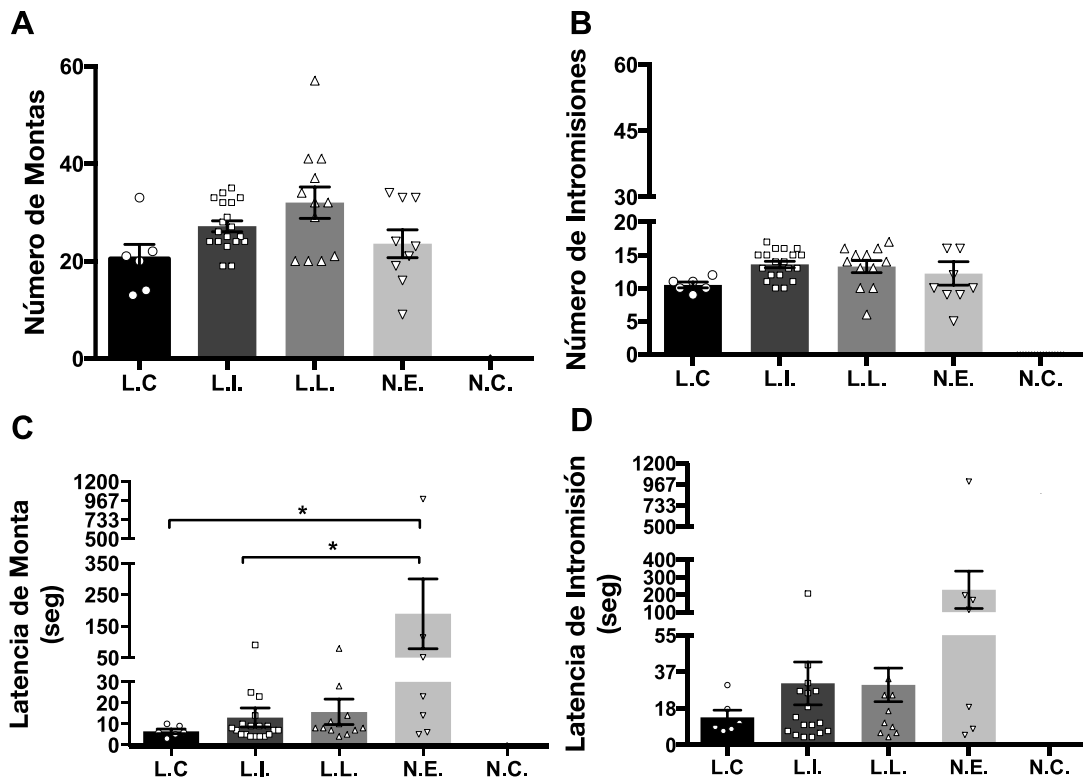


Figura 3. El número de montas e intrusiones, así como las latencias de intrusión no difieren significativamente entre los fenotipos copulatorios identificados en la población evaluada de ratas macho. Gráficas de barras que ilustran el número de montas (A) e intrusiones (B) y las latencias de monta (C) e intrusión (D) (promedio ± error estándar) en ratas consideradas como copuladoras de latencia eyaculatoria corta (L.C.), intermedia (L.I.) o larga (L.L.), como copuladores no eyaculadores (N.E.) o como no copuladores (N.C.). Existen diferencias significativas entre las latencias de monta para los machos considerados de L.C. y L.I. contra aquellos N.E. ANOVA Kruskal-Wallis; prueba *Post hoc* Dunn: * $p < 0.05$.

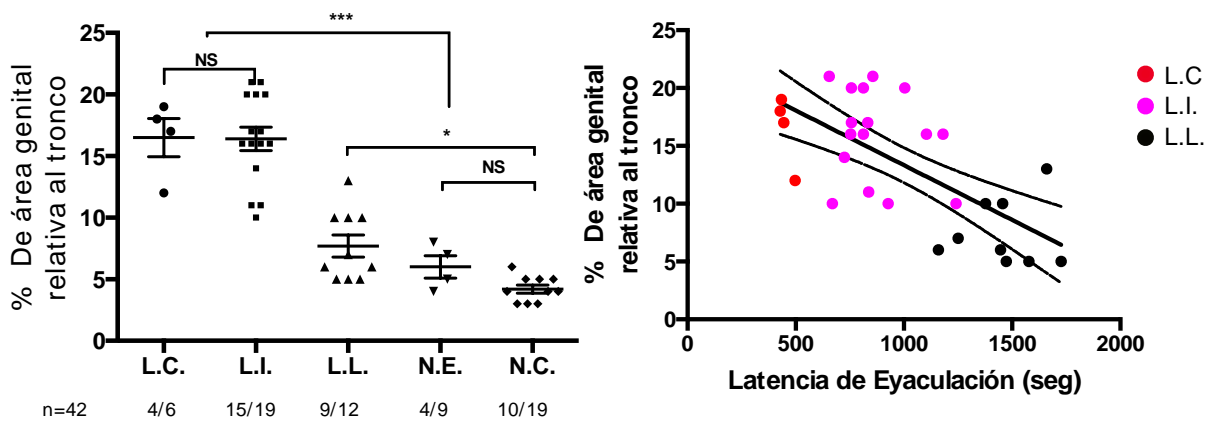
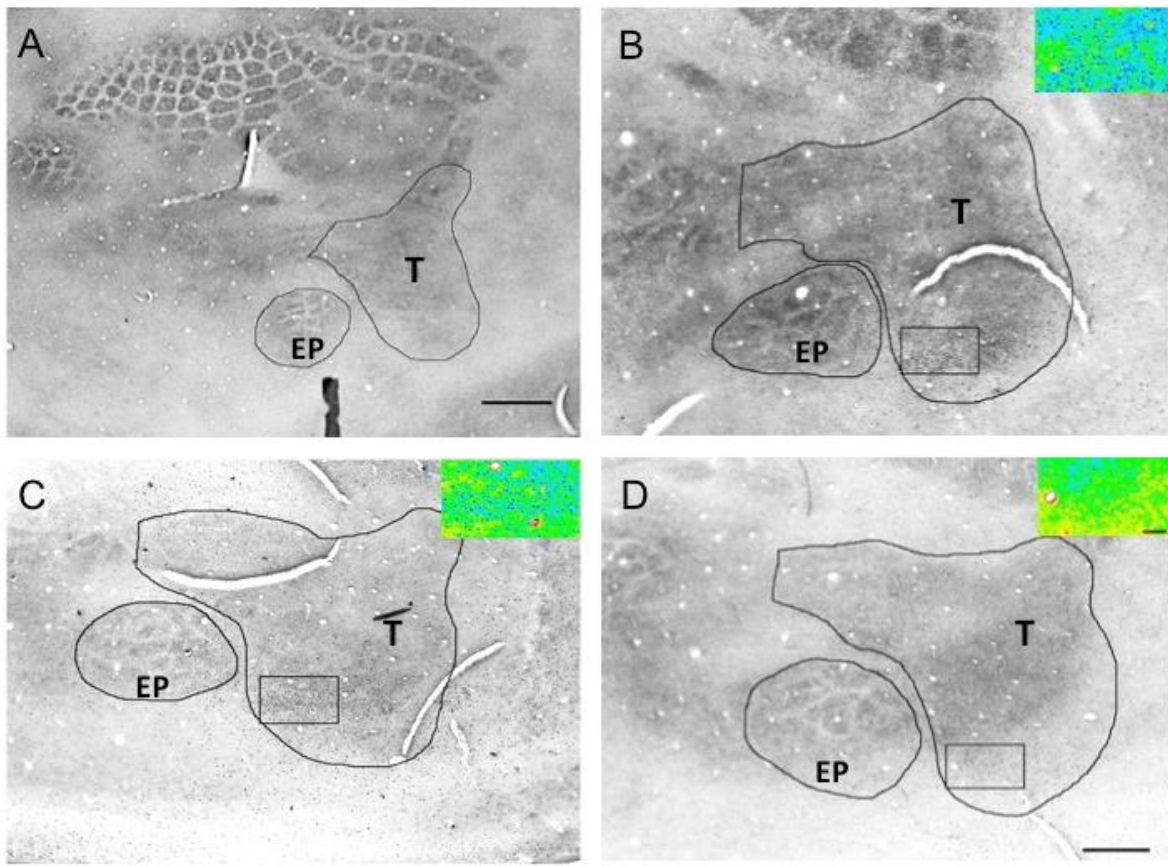


Figura 4. El área ocupada por neuronas activadas en la S1 en respuesta a la estimulación mecánica de los genitales externos difiere entre las ratas macho en función de su latencia de eyaculación A. Fotomicrografía digital que muestra un corte tangencial obtenido a través de la S1 en una rata macho. Se destaca la representación del tronco (T) y la extremidad posterior (EP). Fotomicrografías digitales que muestran cortes tangenciales representativos de la región genital en S1 de ratas macho estimuladas mecánicamente en los genitales externos en libre movimiento clasificadas como (B) de latencia eyaculatoria intermedia (L.I.); (C) de latencia eyaculatoria larga (L.L.) y (D) no copuladores (N.C.). Los insertos en cada imagen ilustran la intensidad de la inmunomarca para cFos en las neuronas trasladadas a un código de color en la que el rojo representa la menor intensidad y el azul la mayor. Se observan delineadas las representaciones del tronco y la extremidad posterior. El recuadro indica la posición relativa de la representación genital. Escala en A: 0.5 mm; en B,C y D: 1 mm; en los insertos: 200 μ m. E. Gráfica de columnas que muestra la dimensión porcentual relativa que ocupa la representación genital cortical

en la S1 de ratas consideradas como copuladoras de latencias de eyaculación corta (L.C.), intermedia (L.I.) y larga (L.L.). Se muestran además las ratas consideradas como copuladoras no eyaculadoras N.E. y no copuladoras (N.C.). ANOVA Kruskal-Wallis $H_{(4,37)}=33.58$; $p<0.001$; prueba *Post hoc* Dunn: * $p<0.05$, *** $p<0.001$. F. Gráfica que muestra la correlación de Spearman entre la dimensión porcentual relativa que ocupa la representación genital cortical en la S1 de ratas consideradas como copuladoras L.C., L.I. y L.L. y su latencia de eyaculación ($r= -0.68$, $p<0.001$).

4. Discusión

La conducta copulatoria en las ratas macho puede ser categorizada. Si bien se presume que esta variación es el resultado de diferencias bioquímicas observadas en grupos neuronales que participan en la regulación de la conducta sexual entre animales que pertenecen a distintas categorías copulatorias, es probable que ellas también reflejasen diferencias en la organización anatomofuncional de los sistemas sensoriales, los cuales también participan en la modulación de las conductas sexual y reproductiva. En apoyo a este último concepto nuestros resultados muestran diferencias en el reclutamiento neuronal cortical entre ratas pertenecientes a distintas categorías copulatorias. Dichas diferencias se ven reflejadas en el área ocupada por grupos neuronales (i.e., representación genital) que responden a la estimulación mecano-sensorial genital en la S1. Así, aquellos animales copuladores que mostraron latencias eyaculatorias cortas e intermedias tuvieron las representaciones genitales corticales en la S1 de mayor tamaño. En contraste, las ratas copuladoras que mostraron latencias de eyaculación largas, las no eyaculadoras y las no copuladoras, tuvieron representaciones genitales de menor tamaño. Diferencias en el proceso de reclutamiento neuronal sensorial también fueron observadas en el sistema olfativo entre ratones macho copuladores y no copuladores al ser expuestos a odorantes sexualmente relevantes. Los animales copuladores mostraron un mayor número de núcleos celulares positivos para cFos en el bulbo olfatorio accesorio y en áreas suplementarias de la vía olfativa tales como son el BNST y el MPOA (Portillo et al., 2013). En conjunto, estos resultados soportan la idea de que las diferencias en la expresión de la conducta copulatoria observada entre las ratas macho reflejan diferencias morfo-funcionales de las vías sensoriales.

Adicionalmente, nuestros datos sugieren estas distinciones morfo-funcionales incluso subyacen las diferencias observadas entre las distintas categorías de ratas copuladoras.

Las diferencias documentadas en el tamaño relativo de la representación genital cortical en la S1 entre los machos agrupados en distintas categorías copulatorias conducen a reflexionar sobre los mecanismos que pudiesen dar origen a ellas. Aunque estos mecanismos son desconocidos, es probable que reflejen eventos o modificaciones de las trayectorias de desarrollo prenatal y/o posnatal. Por ejemplo, se ha reportado que el aseo genital materno favorece el proceso de maduración de los grupos neuronales de la medula espinal en la transición lumbo sacra. relacionados con el control de la cópula (Moore, 1992; Lenz & Sengelaub, 2006, 2010). También se reconoce que el aseo genital condiciona la conducta copulatoria en los machos de forma tal que aquellos más estimulados en el periodo posnatal temprano expresan una conducta copulatoria más consistente en la edad adulta (Moore, 1992; Lenz & Sengelaub, 2010). Con esto en mente, uno podría especular que los machos copuladores de latencias eyaculatorias cortas e intermedias fueron más aseados por sus madres que aquellos que muestran latencias eyaculatorias largas, que aquellos que copulan, pero no eyaculan y que aquellos que no copulan.

El área ocupada por las representaciones funcionales en la corteza cerebral puede ser modulada por el tono inhibitorio producido por la circuitería GABAérgica local (i.e., inhibición lateral; Derdikman et al., 2003; Griffen & Maffei, 2014; Lehmann et al., 2012; Porter & Nieves, 2013; Sato et al., 2008). Cuando el tono de la inhibición lateral es alto, el área de representación funcional del territorio activado en respuesta a un estímulo mecano-sensorial aplicado en un segmento específico del cuerpo, se observará disminuida (Porter & Nieves, 2013). Lo opuesto se obtiene cuando el tono inhibitorio es bajo (Moore et al., 1999). Así las diferencias observadas en el tamaño del área que ocupan las representaciones genitales corticales en los animales que muestran distintas categorías copulatorias, podrían reflejar también diferencias categóricas en

la morfo-fisiología de las interneuronas GABAérgicas (v.g. tono inhibitorio), posiblemente adquiridas durante el desarrollo pre y posnatal asociadas o no a la intensidad del aseo materno.

El tamaño relativo de las representaciones del mapa corporal contenido en la S1 refleja, en parte, la densidad de inervación de los segmentos corporales a los que ellas representan (Purves, 1988). Así, órganos mecano-sensoriales como las vibrisas que poseen una alta densidad de inervación se encuentran sobre representados en la S1. Por consiguiente, sería posible que los órganos genitales en las ratas copuladoras que tienen latencias de eyaculación cortas e intermedias tuviesen un mayor grado de inervación que aquellas copuladoras de latencia eyaculatoria larga, copuladoras no eyaculadoras y aquellas no copuladoras (Rowland et al., 1997; 2000; Rowland, 1998; Xin et al., 1997).

Finalmente, una cuarta posibilidad que permitiría explicar los hallazgos reportados se relaciona con diferencias en el umbral de respuesta y/o en la facilidad de reclutamiento de las fibras nerviosas periféricas que inervan a los genitales en las ratas de distintas categorías copulatorias (Kohno et al., 2003). Un bajo umbral de respuesta asociado con un alto reclutamiento periféricos facilitaría la activación de un mayor número de neuronas en la representación genital contenida en la S1; lo contrario sería observado bajo las condiciones opuestas.

La categorización descrita en el presente trabajo sugiere la existencia de al menos cinco expresiones diferentes de la conducta copulatoria en las ratas macho. Estas categorías son distintas de las reportadas en trabajos previos que sugieren la existencia de dos, tres (Alexander et al., 1993; De Gasperín-Estrada et al., 2008; Larsson, 1961) o hasta cuatro (Olivier et al., 2006; Pattij et al., 2005) categorías. Las diferencias en el número de categorías reportado en los distintos estudios podrían reflejar distinciones biológicas entre cepas y/o condiciones diferentes de bioterio (e.g., nutrición, niveles de estrés), de diseño experimental (e.g., duración del entrenamiento, duración de las pruebas copulatorias, ausencia o presencia de claves sensoriales indicadoras de riesgo de competencia en las arenas copulatorias) y criterios de selección de los

machos incorporados en el estudio (e.g., las ratas copuladoras de latencia extra larga generalmente son desechados de los estudios, Ferreira-nuño et al., 2010; Olayo-Lortia et al., 2014).

En un estudio reciente se mapeó mediante procedimientos electrofisiológicos la representación de los genitales en la rata macho. En este estudio se propone que la representación genital cortical en la S1 ocupa un área que se extiende desde la porción ventral de las representaciones del tronco hasta las representaciones de las extremidades anterior y posterior. En nuestro estudio, el área ocupada por la representación genital abarca una fracción del área ventral de la representación del tronco. La discrepancia de la extensión de la representación genital entre ambos estudios pudiera deberse a que el mapeo morfo-funcional llevado a cabo en nuestro trabajo se realizó en animales en vigilia y en libre movimiento, mientras que en Lenschow et al. (2015) los animales fueron registrados bajo anestesia conducida con uretano. Se ha reportado que los anestésicos disminuyen el tono de la inhibición lateral produciendo una expansión de las representaciones de los segmentos corporales estimulados bajo estas condiciones (Buonomano & Merzenich, 1998). No obstante las diferencias entre los estudios comentados, la ubicación anatómica relativa de la representación genital cortical en la S1 reportada por nosotros y por Lenschow et al. (2015) en la rata es coincidente con aquella sugerida para macacos y seres humanos (Cazala et al., 2015; Kakigi et al., 2000; Penfield, Wilder & Jasper, 1954; Penfield & Rasmussen, 1950; Rothmund et al., 2002).

En conclusión:

- 1) Existe una representación anatómica y funcional de los órganos genitales externos en la corteza somatosensorial primaria (S1) de la rata macho. Esta se localiza en la región ventral de la representación del tronco cercana a la emergencia de la representación de la extremidad posterior.

- 2) Se propusieron cinco categorías copulatorias en función de la latencia de eyaculación.
- 3) El área funcional ocupada por células activadas en la región de los genitales externos de S1 varió en función de la latencia de eyaculación, siendo mayor en las ratas de latencia eyaculatoria corta o intermedia.

5.Agradecimientos

Diana C. Esquivel Franco es estudiante del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y recibió la beca número 291062 de CONACYT.

Capítulo 3

Comportamiento sexual en ratas macho noqueadas al transportador de serotonina

Esquivel-Franco, D.C^{1,2,3}, Wieggersma, A.M.¹, Janssen, J.A.¹, Colaprete, C.¹, Olivier, B.^{1,4,5}
and Olivier, J.D.A.¹

1. Groningen Institute for Evolutionary Life Sciences (GELIFES), Neurobiology, University of Groningen, Groningen, the Netherlands
2. Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.
3. Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB). Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.
4. Dept. of Psychopharmacology, Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences, Science Faculty, Utrecht University, Utrecht, the Netherlands
5. Department of Psychiatry, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA

Manuscrito enviado

Resumen

La serotonina (5-HT) juega un papel clave en el comportamiento sexual masculino. En general, una disminución en la función de la serotonina facilita, mientras que un aumento inhibe el comportamiento sexual. La mayor parte de la investigación básica sobre el papel de la serotonina en el funcionamiento sexual se ha realizado en ratas. La rata noqueada al transportador de serotonina (SERT) ($SERT^{-/-}$) se creó en 2006, y la disponibilidad de este modelo ofrece una posibilidad única de estudiar la función del gen SERT y su ausencia en las consecuencias del comportamiento sexual. Desarrollamos un estudio previo que investigó los efectos de la pérdida reducida o total de la función del gen SERT en el rendimiento sexual de la rata macho. Las ratas macho $SERT^{+/+}$, $SERT^{+/-}$ y $SERT^{-/-}$ se evaluaron en una prueba de rendimiento sexual semanal de 30 minutos, durante seis semanas. En una gran cohorte, confirmamos que las ratas $SERT^{-/-}$ tienen una expresión significativamente menor de rendimiento sexual y demostramos que este fenotipo ya estaba presente en etapas muy tempranas y no podía compensarse con la experiencia sexual. Específicamente, el número de eyaculaciones, montas y la relación o índice de intromisión fueron significativamente menores en ratas $SERT^{-/-}$ en comparación con las ratas $SERT^{+/+}$ y $SERT^{+/-}$. Las ratas $SERT^{+/-}$ no diferían de las ratas $SERT^{+/+}$ en la expresión del comportamiento sexual. La disminución en el rendimiento sexual de las ratas $SERT^{-/-}$ se parece mucho a la disfunción sexual inducida por la administración crónica de inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) en ratas macho. En conclusión, las ratas $SERT^{-/-}$ pueden servir como modelo animal para estudiar la disfunción sexual en hombres inducida por la administración de ISRS.

Palabras clave: serotonina, transportador de serotonina, comportamiento sexual masculino, disfunción sexual, rata noqueada del transportador de serotonina, inhibidor selectivo del transportador de serotonina, disfunción serotoninérgica, función genética, modelos de roedores, administración crónica de ISRS

1. Introducción

El papel de la serotonina en el comportamiento sexual ha sido ampliamente estudiado y se ha establecido que este neurotransmisor está altamente involucrado y juega un papel modulador en el comportamiento sexual (de Jong et al., 2006; Hull et al., 1999; Hull et al., 2004; Rowland et al., 2010; Uphouse & Guptarak, 2010). Las alteraciones en la neurotransmisión serotoninérgica pueden conducir a dificultades de comportamiento sexual en los hombres, v.g. con una alta prevalencia de trastornos eyaculatorios (Higgins, Nash, & Lynch, 2010; Shankar, 2014; Waldinger, 1998). Los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS), que bloquean la recaptura de serotonina (5-HT) a través del transportador de serotonina (SERT), aumentan la disponibilidad de serotonina en la hendidura sináptica (Chan et al., 2011; Stahl, 1998). Este aumento agudo conlleva diferentes efectos secundarios sexuales que se han atribuido a la desensibilización gradual de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2C} (El Mansari & Blier, 2005; Le Poul et al., 1995; Snoeren et al., 2014). El uso crónico de los ISRS generalmente resulta en un conjunto de quejas de usuarios masculinos que se centran en el aumento del umbral de eyaculación, que se traduce en una latencia de eyaculación retrasada o, a veces, incluso en ausencia de eyaculación, asociada con una reducción en el deseo sexual (Balon, 2006; Hirschfeld, 2003; Rubio-Casillas et al., 2015; Waldinger, 1998).

Los estudios en ratas muestran que cuando los ISRS se administran crónicamente, se altera el comportamiento sexual y se puede aumentar la cantidad de estimulación necesaria para eyacular (Chan et al., 2010; de Jong et al., 2005). El uso de animales genéticamente modificados para el gen SERT (SERT^{+/-}, SERT^{-/-}) ha dado la oportunidad de estudiar cuáles son las consecuencias de la ausencia parcial (50%) o total (100%) de transportadores de serotonina en ratas (J. R. Homberg et al., 2007). En estudios previos de Chan et al. (2011), se planteó la hipótesis de que estos animales genéticamente modificados mostrarían alteraciones en los comportamientos sexuales comparables a los expresados por animales bajo administración

crónica de ISRS (de Jong et al., 2005; Ferguson, 2001; Oosting et al., 2016). El estudio de Chan et al. (2011) demostró que los animales SERT^{-/-} homocigotos sin expresión de los niveles de SERT presentan comportamientos sexuales diferentes y sugiere que un grupo sensibilizado de receptores 5-HT_{1A} está involucrado en la regulación de las actividades sexuales en dichos animales.

En nuestra investigación utilizamos ratas noqueadas de tipo salvaje (SERT^{+/+}), homocigotas (SERT^{-/-}) y heterocigotas (SERT^{+/-}). La disminución en la expresión de los niveles de SERT se correlaciona con el porcentaje de unión a los sitios de SERT cuando los ISRS se administran crónicamente en humanos (Kugaya et al., 2003). Se ha demostrado previamente que al menos a nivel molecular estos genotipos tienen diferente disponibilidad de serotonina, los animales noqueados tienen niveles mínimos de 5-HT, liberación reducida de 5-HT inducida por despolarización y niveles basales extracelulares amplificados de 5-HT (J. R. Homberg et al., 2007). Independientemente de la reducción en la proteína SERT, los niveles de tejido 5-HT en las ratas SERT^{+/-} no son diferentes de las ratas SERT^{+/+} (J. R. Homberg et al., 2007). En el aspecto conductual, las ratas SERT^{-/-} muestran un aumento de ansiedad y los comportamientos similares a la depresión (Olivier et al., 2011; Olivier et al., 2008; Rothman et al., 2003).

En el presente estudio, comparamos los datos de comportamiento sexual de las seis sesiones de experimentos de comportamiento sexual de 30 minutos realizadas con ratas SERT^{-/-} y SERT^{+/-} junto con tipo salvaje (wildtype SERT^{+/+}) como controles. Nuestros resultados replican hallazgos anteriores, pero se extienden porque comparamos el comportamiento entre los tres genotipos diferentes en una gran cohorte de animales. Demostramos que el fenotipo de comportamiento sexual reducido en ratas SERT^{-/-} ya está presente en una etapa temprana durante las sesiones de entrenamiento y no puede compensarse con una amplia experiencia sexual.

En este estudio, comparamos los datos de comportamiento sexual (recopilados durante 2 años de experimentación) de las 6 sesiones de experimentos de comportamiento sexual de 30 minutos realizadas con ratas SERT^{-/-} y SERT^{+/-} junto con ratas de tipo salvaje (SERT^{+/+}) como controles.

2. Materiales y métodos

2.1 Animales

La rata SERT noqueada (S1c6a41Hubr) fue generada por mutagénesis inducida por ENU seleccionada por el objetivo (para detalles, ver Smits et al., 2006). Las ratas Wistar fueron criadas en nuestra instalación de animales (Universidad de Groningen) cruzando machos y hembras SERT^{+/-}, lo que resultó en ratas machos y hembras SERT^{+/+}, SERT^{+/-} y SERT^{-/-}. Utilizamos ratas machos SERT^{+/+}, SERT^{+/-} y SERT^{-/-} de al menos 12 semanas para realizar experimentos de comportamiento sexual. Se utilizaron hembras SERT^{+/+} y SERT^{+/-} como animales de estímulo sexual. Los animales se alojaron en condiciones de luz/oscuridad invertida (luz de 12 h: oscuridad de 12 h, luces apagadas de 8:00 a.m. a 8:00 p.m.). Los animales fueron alojados socialmente (2-5 por jaula, máximo 4 para machos). Se proporcionaron bloques de madera y material de anidación para el enriquecimiento de la jaula. Las ratas tenían acceso *ad libitum* a comida y agua. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las pautas gubernamentales para el cuidado y uso de animales de laboratorio (Comité Central de Pruebas de Animales). Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar la cantidad de animales y el posible sufrimiento.

2.2 Ratas hembras

Las hembras fueron sometidas a ligadura doble de trompas para evitar gestaciones. Para la cirugía, las hembras se anestesiaron (isoflurano) y se les proporcionó alivio para el dolor por vía subcutánea (fynadina, 0.1 mg / 100 g) justo antes de la cirugía y a las 24 y 48 horas después

de la cirugía. Las hembras tenían al menos 12 semanas de edad cuando se realizó la cirugía, y tuvieron dos semanas de recuperación antes de que se les indujera la receptividad sexual con estradiol (50 µg en 0.1 ml de aceite, S.C., 36-48 horas antes de la prueba) para las pruebas de comportamiento sexual. Las hembras se usaron una vez cada dos semanas y no más de 2 veces por día experimental.

2.3 Pruebas de comportamiento sexual

Después de las pruebas de comportamiento sexual de 6 semanas (30 min / prueba), las ratas macho fueron consideradas sexualmente entrenadas como se mostró anteriormente (Chan et al., 2008; Olivier et al., 2006; Pattij et al., 2005). Un total de 229 animales (97 SERT^{+/+}, 62 SERT^{+/-} y 70 SERT^{-/-}) fueron utilizados. Las ratas fueron habituadas durante 10 minutos en la arena de prueba justo antes de una sesión de comportamiento sexual. Al final del período de habituación, se introdujo una hembra receptiva en la arena y se evaluó el comportamiento sexual durante 30 minutos. Las hembras no receptivas se cambiaron por una hembra receptiva diferente en 5 minutos. La prueba se realizó en cajas de prueba rectangulares de madera (57 cm x 82 cm x 39 cm; pared de vidrio) llenas de material de cama regular que no se cambió durante la prueba para preservar las feromonas de rondas anteriores y crear un ambiente sexual más competitivo. Todo el comportamiento durante la prueba de 30 minutos se grabó en video después de la presentación de la hembra y también se evaluó en vivo el número de eyaculaciones. Además del número de eyaculaciones (E) en 30 minutos, se registraron los siguientes parámetros de la primera serie de eyaculación (Chan et al., 2011): número de montas (M), número de intromisiones (I), latencia (s) de la primera monta (LM), latencia (s) de la primera intromisión (LI) y latencia (s) de la primera eyaculación (LE), pero solo para las semanas 2,3 y 6. Después de la eyaculación, el intervalo post eyaculatorio (IPE) fue calculado, utilizando el tiempo desde la primera eyaculación y el tiempo de la primera monta / intromisión (lo que ocurra primero)

de la segunda serie de eyaculación. La relación de intromisión (RI) se calculó como: $RI = (\# I / (\#I + \#M)) * 100\%$. La LE se calculó utilizando el tiempo de la primera serie de eyaculación menos la latencia de intromisión de la primera serie de eyaculación. Representamos las semanas 2, 3 y 6 para tener una buena comparación de comportamiento. Todas las sesiones y experimentos de comportamiento sexual se realizaron en condiciones de luz roja entre las 10 a.m. y las 5 p.m.

2.4 Análisis estadísticos

Todos los datos tuvieron una distribución normal y se analizaron con pruebas paramétricas de ANOVA de dos vías, como post hoc se utilizó la prueba Dunn (entre grupos) y ANOVA de una vía, como post hoc se utilizó la prueba Bonferroni (dentro del grupo) para analizar los datos. Todos los datos se analizaron con el software GraphPad Prism 6.0 (Graph Pad Software Inc., La Jolla, EE. UU.). El nivel de significancia se estableció en $p < 0.05$. Los datos se expresan como media \pm SEM.

Se reporta el porcentaje de animales de acuerdo al número de eyaculaciones por semana como datos descriptivos.

3. Resultados

3.1 Estabilidad sexual en la frecuencia de eyaculación

El desempeño sexual de los animales se estabilizó en el transcurso de las seis sesiones de comportamiento sexual. Durante este período, se evaluó el número de eyaculaciones y los animales mostraron un comportamiento eyaculatorio estable después de aprox. tres pruebas consecutivas (figuras 1 y 2; tabla 1 y 2). Las frecuencias de eyaculación de los animales SERT^{+/-} nunca son significativamente diferentes de las ratas SERT^{+/+}, sin embargo, las ratas SERT^{-/-} tuvieron frecuencias de eyaculación significativamente más bajas en comparación con SERT^{+/+}

($F_{(5, 572)} = 8.19$; $p < 0.001$) y SERT +/- ($F_{(5, 362)} = 4.31$; $p < 0.001$) ratas; Estas diferencias entre los genotipos se ven desde la segunda sesión de comportamiento sexual en adelante. Durante las pruebas posteriores, la mayoría de los animales aumentaron el número de eyaculaciones (figuras 2 y 3). En la primera prueba, más del 60% de todos los animales no eyacularon. SERT^{+/+} y SERT^{+/-} aumentaron rápidamente sus eyaculaciones a un promedio de 1 a 2 por prueba. Aprox. El 20% de los animales SERT^{-/-} nunca eyaculó durante ninguna prueba, mientras que alrededor del 5% en las ratas SERT^{+/+} y SERT^{+/-} no eyacularon. En las últimas 3 pruebas (semana 4-6) el nivel de números de eyaculación fue estable. Las ratas SERT^{+/+} y SERT^{+/-} no diferían en esta medida, las ratas SERT^{-/-} se estabilizaron a aprox. 50-60% de este nivel.

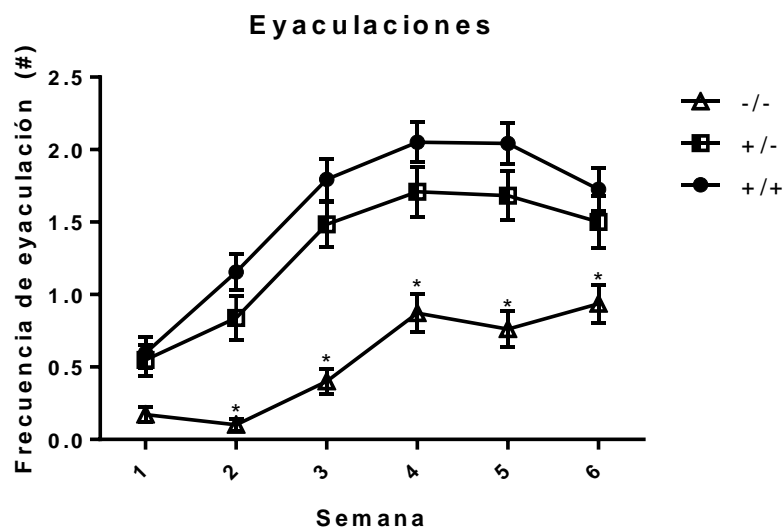


Figura 1. Distribución del número de eyaculaciones de ratas macho (frecuencia media de eyaculaciones \pm SEM por prueba) evaluadas semanalmente durante 6 semanas (total N= 229; SERT^{+/+} n = 97, SERT^{+/-} n = 62 y SERT^{-/-} n = 70). *: $p < 0.05$ en comparación con SERT^{+/+} y SERT^{+/-}.

Tabla 1: Frecuencia de eyaculación durante 6 semanas de entrenamiento de ratas macho Wistar SERT^{+/+}, SERT^{+/-} y SERT^{-/-}, análisis grupal.

SERT	Semana						ANOVA de una vía
	1 Media ± SEM	2 Media ± SEM	3 Media ± SEM	4 Media ± SEM	5 Media ± SEM	6 Media ± SEM	
+/+	0.59±0.10	1.15±0.12 A	1.79±0.14 A,B	2.05±0.13 A,B	2.04±0.13 A,B	1.72±0.14 A,B	F _(5, 572) = 8.19; P < 0.001
+/-	0.54±0.10	0.83±0.14	1.48±0.15 A,B	1.71±0.17 A,B	1.68±0.17 A,B	1.50±0.17 A,B	F _(5, 362) = 4.31; P < 0.001
-/-	0.17±0.05	0.10±0.04	0.40±0.08	0.87±0.13 A,B,C	0.76±0.12 A,B	0.93±0.13 A,B,C	F _(5, 400) = 15.37; P < 0.001

Tabla 1: Frecuencia de eyaculación durante 6 semanas de entrenamiento de ratas machos Wistar SERT^{+/+}, SERT^{+/-} y SERT^{-/-}, análisis grupal. A = Significativamente (p < 0.05) diferente de la semana 1. B = Significativamente (p < 0.05) diferente de la semana 2. C = Significativamente (p < 0.05) diferente de la semana 3.

Tabla 2: Frecuencia de eyaculación durante 6 semanas de entrenamiento de ratas macho Wistar SERT^{+/+}, SERT^{+/-} y SERT^{-/-}, análisis entre grupos.

Comparación	Week						ANOVA de 2 vías
	1	2	3	4	5	6	
+/+ vs +/-	ns	ns	ns	ns	ns	ns	F _(2, 1334) = 89.25; P < 0.001
+/+ vs -/-	ns	P<0.001	P<0.001	P<0.001	P<0.001	P<0.01	
+/- vs -/-	ns	P<0.05	P<0.001	P<0.01	P<0.01	ns	

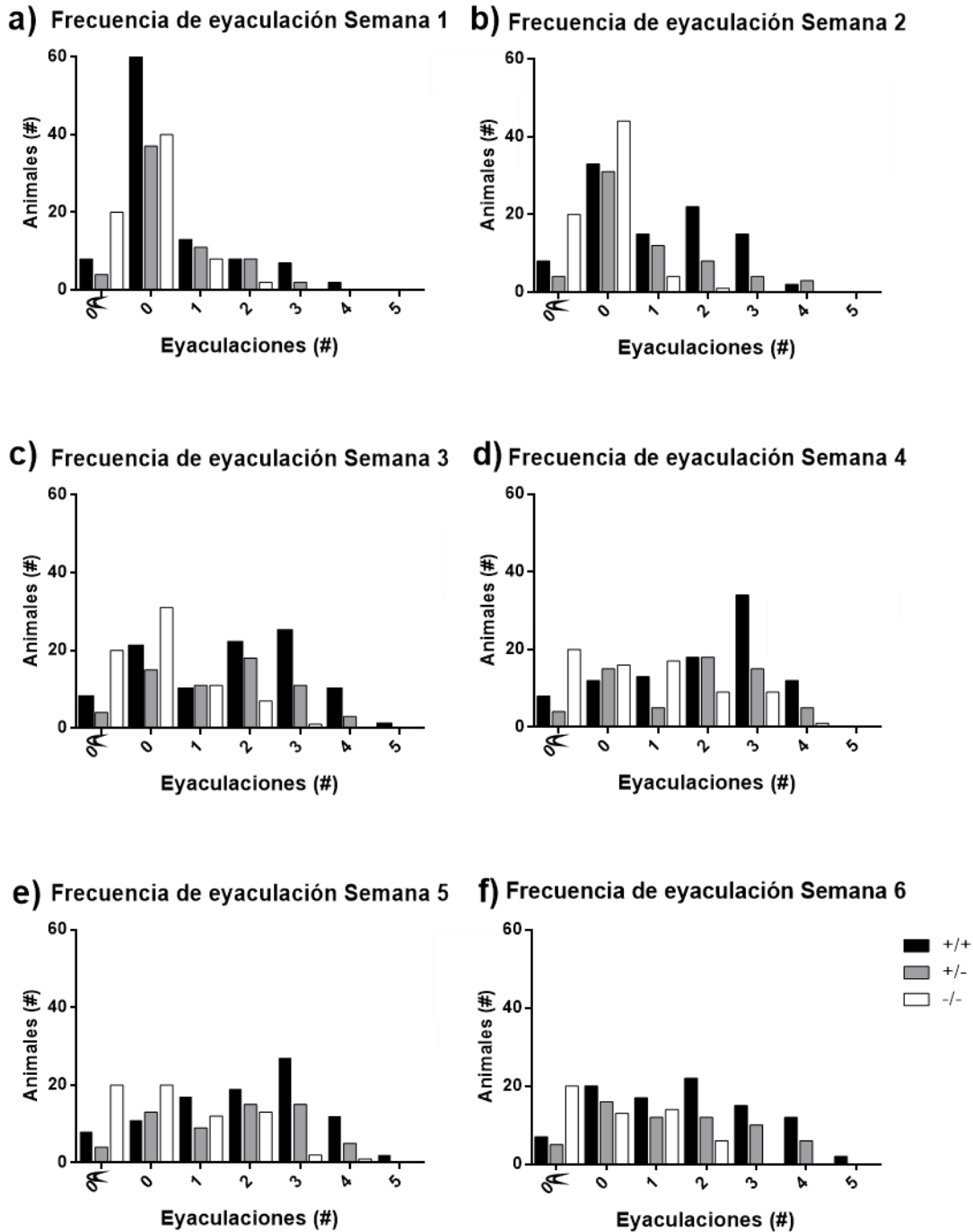


Figura 2. Distribución semanal de animales y frecuencias de eyaculación (total n = 229; SERT^{+/+} n = 97, SERT^{+/-} n = 62 y SERT^{-/-} n = 70) durante las 6 semanas de comportamiento sexual. 0: animales que no alcanzaron la eyaculación en ninguna prueba de comportamiento sexual.

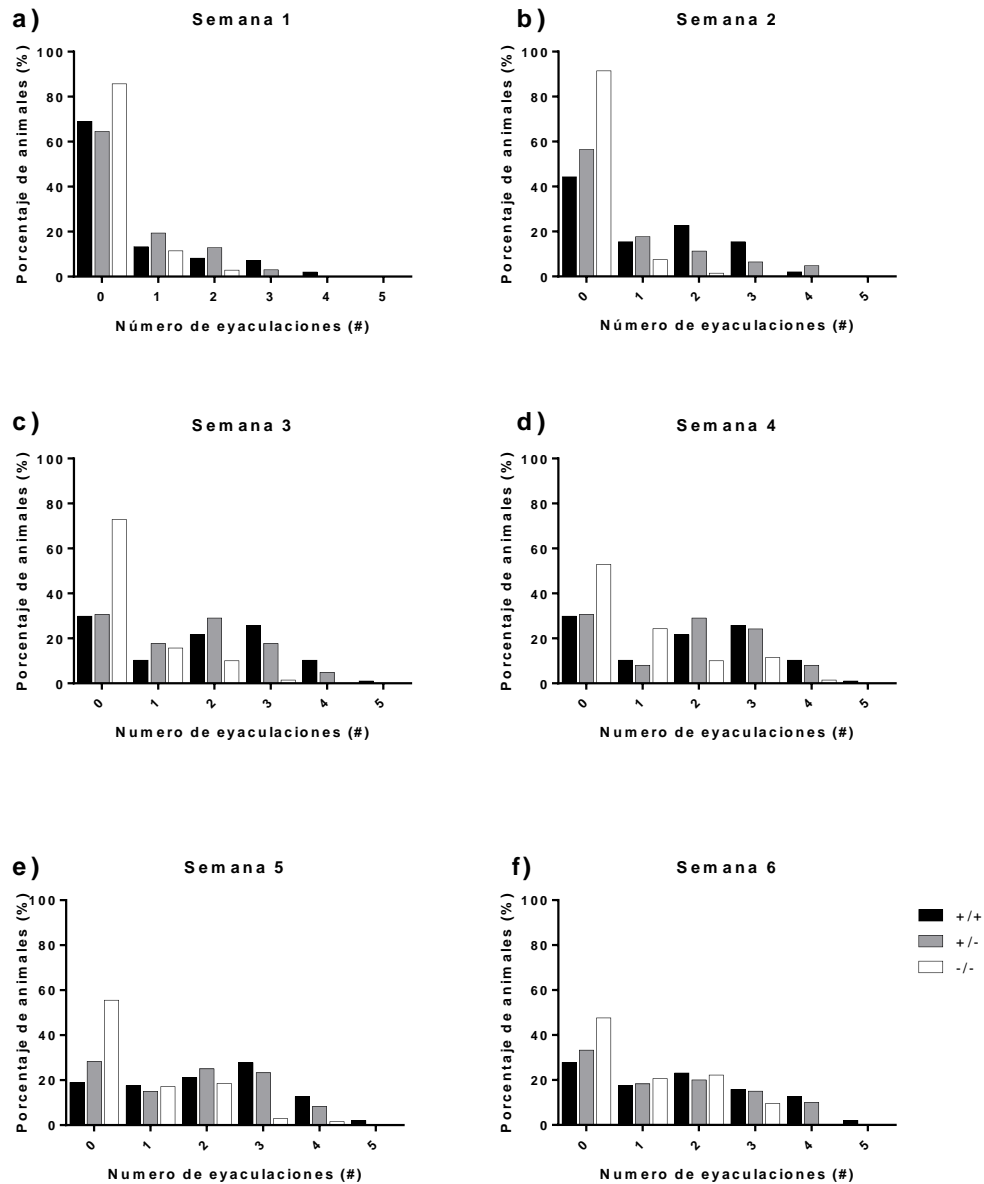


Figura 3. Porcentaje de animales y número de eyaculaciones por semana (total n = 229; SERT^{+/+} n = 97, SERT^{+/-} n = 62 y SERT^{-/-} n = 70) durante las 6 semanas de comportamiento sexual.

3.2 Parámetros sexuales durante las semanas 2, 3 y 6

Para hacer que este párrafo sea más legible, trasladamos las estadísticas a las tablas 3 y 4. Durante las tres sesiones de comportamiento sexual en las que se calificó todo el comportamiento sexual, se encontraron diferencias en varios parámetros sexuales. El número

de eyaculaciones (fig. 4a) fue significativamente mayor en la semana 6 para todos los genotipos (tabla 4), pero significativamente menor para los animales $SERT^{-/-}$ en la semana 2 ($p < 0.001$), 3 ($p < 0.001$) y 6 ($p < 0.001$) en comparación con las ratas $SERT^{+/+}$, en cuanto a $SERT^{+/-}$ en la semana 2 ($p < 0.01$), la semana 3 ($p < 0.001$) y la semana 6 ($p < 0.05$). En línea con estos datos, la latencia de eyaculación (figura 4d) para todos los genotipos se redujo significativamente en la semana 6 (ver tabla 3), aunque para $SERT^{-/-}$ esta latencia fue significativamente mayor en comparación con los animales $SERT^{+/+}$ en la semana 2 ($p < 0.001$), semana 3 ($p < 0.001$) y la semana 6 ($p < 0.001$), así como en comparación con las ratas $SERT^{+/-}$ en la semana 2 ($p < 0.01$) y la semana 6 ($p < 0.01$). El número de montas (figura 4b) no difirió entre genotipos y semanas de rendimiento sexual, pero la latencia de este parámetro (figura 4e) fue significativamente mayor en ratas $SERT^{-/-}$, que mostraron una latencia más alta en la semana 2 ($p < 0.01$) y la semana 3 ($p < 0.01$) en comparación con las ratas $SERT^{+/+}$ y en la semana 3 ($p < 0.05$) en comparación con las ratas $SERT^{+/-}$. El número de intromisiones (figura 4c) fue solo menor para los animales $SERT^{-/-}$ en comparación con $SERT^{+/+}$ en la segunda semana ($p < 0.01$), para las semanas restantes solo fue diferente entre $SERT^{-/-}$, mientras que la latencia de intromisión la (figura 4f) disminuyó en los tres genotipos en la semana 3 en comparación con la semana 2 (ver tabla 4) y solo para $SERT^{+/+}$ y $SERT^{+/-}$ en la semana 6 (ver tabla 4). pero mayor para $SERT^{-/-}$ comparado con $SERT^{+/+}$ en las semanas 2 ($p < 0.001$) y 3 ($p < 0.05$) y comparado con $SERT^{+/-}$ en la semana 3 ($p < 0.01$). En el intervalo posterior a la eyaculación (figura 4g), los animales no mostraron diferencias significativas entre los genotipos y la experiencia sexual durante semanas; la relación de intromisión (figura 4h) fue significativamente diferente para todos los genotipos en la semana 6 (ver tabla 4), para los animales $SERT^{+/+}$ disminuyó significativamente, mientras que para $SERT^{+/-}$ y $SERT^{-/-}$ aumentó significativamente en comparación a la semana 2. En las semanas 2 ($p < 0.001$) y 3 ($p < 0.01$) $SERT^{-/-}$ tuvo una relación

de intromisión más baja que las ratas de tipo salvaje. Además, en la semana 2 ($p < 0.001$) las ratas $SERT^{+/-}$ tuvieron un IR significativamente menor en comparación con las ratas $SERT^{+/+}$.

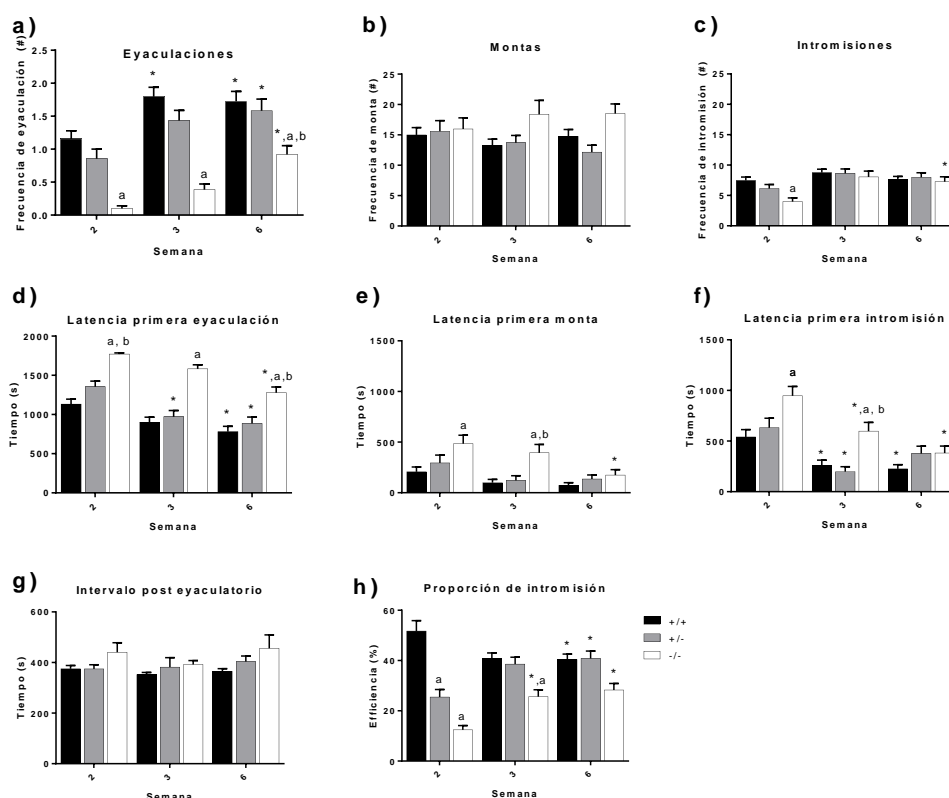


Figura 4. Comportamiento sexual de ratas macho (total $n = 229$; $SERT^{+/+}$ $n = 97$, $SERT^{+/-}$ $n = 62$ y $SERT^{-/-}$ $n = 70$) durante las sesiones de comportamiento sexual de las semanas 2, 3 y 6. Datos se expresan como la media \pm SEM. El número y la latencia de las eyacuaciones en 30 min (a, d), el número y la latencia de las montas (b, e), el número y la latencia de las intromisiones (c, f), el intervalo post eyaculatorio (g) y la relación de intromisión (h) de la primera serie eyaculatoria. Los análisis estadísticos detallados (ANOVA de medidas repetidas) se muestran en las Tablas 3 y 4. a: diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación con $SERT^{+/+}$. b: diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación con $SERT^{-/-}$. *: diferencia significativa en comparación con la semana 2 ($p < 0.05$).

Tabla 3: Rendimiento del comportamiento sexual de las semanas de entrenamiento 2, 3 y 6 de ratas macho Wistar $SERT^{+/+}$, $SERT^{+/-}$ y $SERT^{-/-}$, análisis grupal.

Semana	2	3	6	ANOVA de una vía
Parámetros medidos	Media \pm SEM	Media \pm SEM	Media \pm SEM	
# E $SERT^{+/+}$	1.15 \pm 0.12	1.79 \pm 0.14	1.72 \pm 0.14	F (2, 286) = 6.37; P = 0.002
$SERT^{+/-}$	0.83 \pm 0.14	1.48 \pm 0.15	1.50 \pm 0.17	F (2, 181) = 5.89; P = 0.003
$SERT^{-/-}$	0.10 \pm 0.04	0.40 \pm 0.08	0.93 \pm 0.13	F (2, 200) = 20.10; P < 0.001
# M 1ª serie				

<i>SERT</i> ^{+/+}	14.98±1.21	13.29±1.00	14.77±1.11	F (2, 286) = 0.68; P = 0.505
<i>SERT</i> ^{+/-}	15.60±1.74	13.69±1.21	12.15±1.14	F (2, 181) = 1.51; P = 0.222
<i>SERT</i> ^{-/-}	15.96±1.83	18.39±2.28	18.52±1.57	F (2, 200) = 0.55; P = 0.573
# 1ª serie				
<i>SERT</i> ^{+/+}	7.47±0.54	8.76±0.55	7.68±0.44	F (2, 286) = 1.77; P = 0.170
<i>SERT</i> ^{+/-}	6.12±0.67	8.64±0.71	7.98±0.74	F (2, 181) = 3.39; P = 0.035
<i>SERT</i> ^{-/-}	3.98±0.60	8.04±0.95 A	7.27±0.79 A	F (2, 200) = 7.44; P = 0.001
Latencia 1ª E (s)				
<i>SERT</i> ^{+/+}	1132.00±64.61	899.80±65.72	781.40±67.03 A	F (2, 286) = 7.351; P < 0.01
<i>SERT</i> ^{+/-}	1354.00±72.62	970.60±80.30 A	885.30±82.32 A	F (2, 181) = 10.15; P < 0.001
<i>SERT</i> ^{-/-}	1770.00±15.56	1582.00±51.45	1277.00±73.78 A	F (2, 200) = 23.12; P < 0.001
Latencia 1ª M (s)				
<i>SERT</i> ^{+/+}	206.80±47.66	99.82±32.02	73.35±26.63	F (2, 286) = 3.71; P = 0.025
<i>SERT</i> ^{+/-}	294.30±77.24	121.90±46.56	135.20±40.34	F (2, 181) = 2.81; P = 0.062
<i>SERT</i> ^{-/-}	484.20±84.27	394.40±82.69	173.80±54.74 A	F (2, 200) = 4.23; P = 0.015
Latencia 1ª I (s)				
<i>SERT</i> ^{+/+}	541.00±71.87	261.70±50.36 A	226.10±41.13 A	F (2, 286) = 9.459; P = 0.001
<i>SERT</i> ^{+/-}	631.90±93.75	198.50±48.92 A	376.03±72.71	F (2, 181) = 8.730; P = 0.001
<i>SERT</i> ^{-/-}	946.70±93.01	597.90±85.98 A	381.60±69.50 A	F (2, 200) = 11.30; P < 0.001
PEI <i>SERT</i> ^{+/+}	375.00±13.45	352.10±8.87	365.10±10.57	F (2, 175) = 1.09; P = 0.336
<i>SERT</i> ^{+/-}	374.90±16.58	381.90±37.17	403.80±22.05	F (2, 96) = 0.26; P = 0.768
<i>SERT</i> ^{-/-}	440.50±37.50	392.20±15.79	356.30±52.75	F (2, 37) = 0.47; P = 0.625
IR ₁ <i>SERT</i> ^{+/+}	51.72±4.14	40.79±2.28	40.39±2.20 A	F (2, 286) = 4.58; P = 0.011
<i>SERT</i> ^{+/-}	25.47±2.98	38.56±2.78	40.82±2.94 A	F (2, 181) = 8.16; P = 0.001
<i>SERT</i> ^{-/-}	12.44±1.69	25.64±2.74 A	28.29±2.60 A	F (2, 200) = 12.7; P < 0.001

Tabla 3: Rendimiento del comportamiento sexual de las semanas de entrenamiento 2, 3 y 6 de ratas macho de la cepa Wistar *SERT*^{+/+}, *SERT*^{+/-} y *SERT*^{-/-}, análisis grupal. M = montas; I = intromisión; E = eyaculación; PEI = intervalo post eyaculatorio; # = número; IR = Relación de intromisión = [# intromisiones / (# intromisiones + # montas)] * 100. A = Significativamente diferente (p < 0.05) de la semana 2.

Tabla 4: Rendimiento del comportamiento sexual de las semanas de entrenamiento 2, 3 y 6 de ratas macho de la cepa Wistar SERT^{+/+}, SERT^{+/-} y SERT^{-/-}, análisis entre grupos.

Comparación	Semana			ANOVA de dos vías
	2	3	6	
<i># E</i>				F (2, 667) = 20.59; P < 0.001
+/+ vs +/-	ns	ns	ns	
+/+ vs +/+	p<0.001	p<0.001	p<0.001	
+/- vs -/-	p<0.01	p<0.001	p<0.05	
<i># M 1ª serie</i>				F (2, 667) = 0.064; P = 0.937
+/+ vs +/-	ns	ns	ns	
+/+ vs +/+	ns	ns	ns	
+/- vs -/-	ns	ns	ns	
<i># I 1ª serie</i>				F (2, 667) = 11.93; P < 0.01
+/+ vs +/-	ns	ns	ns	
+/+ vs +/+	p<0.01	ns	ns	
+/- vs -/-	ns	ns	ns	
<i>Latencia 1ª E (s)</i>				F (2, 667) = 31.58; P < 0.001
+/+ vs +/-	ns	ns	ns	
+/+ vs +/+	p<0.001	p<0.001	p<0.001	
+/- vs -/-	p<0.01	ns	p<0.01	
<i>Latencia 1ª M (s)</i>				F (2, 667) = 9.73; P < 0.01
+/+ vs +/-	ns	ns	ns	
+/+ vs +/+	p<0.01	p<0.01	ns	
+/- vs -/-	ns	p<0.05	ns	
<i>Latencia 1ª I (s)</i>				F (2, 667) = 26.56; P < 0.001
+/+ vs +/-	ns	ns	ns	
+/+ vs +/+	p<0.001	p<0.05	ns	
+/- vs -/-	ns	p<0.01	ns	
<i>PEI</i>				F (2, 308) = 0.56; P = 0.566
+/+ vs +/-	ns	ns	ns	
+/+ vs +/+	ns	ns	ns	
+/- vs -/-	ns	ns	ns	
<i>IR₁</i>				F (2, 667) = 42.74; P < 0.001
+/+ vs +/-	p<0.001	ns	ns	
+/+ vs +/+	p<0.001	p<0.01	ns	
+/- vs -/-	ns	ns	ns	

Tabla 4: Rendimiento del comportamiento sexual de las semanas de entrenamiento 2, 3 y 6 de ratas macho de la cepa Wistar SERT^{+/+}, SERT^{+/-} y SERT^{-/-}, análisis entre grupos. M = montas; I = intromisiones; E = eyaculación;

PEL = intervalo post eyaculatorio; # = número; IR = Relación de intromisión = $[\# \text{ intromisiones} / (\# \text{ intromisiones} + \# \text{ montas})] * 100$.

4. Discusión

La importancia de la serotonina en la expresión del comportamiento sexual masculino ha sido demostrada por varios estudios y las modificaciones en esta actividad y niveles de neurotransmisores están relacionados con la inhibición (aumento de los niveles de serotonina) o la facilitación (disminución de los niveles de serotonina) de este comportamiento (Chan et al., 2011; Olivier et al., 2011). En el momento en que entrenamos ratas macho adultas genéticamente modificadas ($SERT^{+/+}$, $SERT^{+/-}$ y $SERT^{-/-}$), encontramos evidencia de apoyo para esta hipótesis, ya que aquellos machos con plena disponibilidad del transportador ($SERT^{+/+}$) realizaron un mayor nivel de comportamiento sexual que aquellos sin él ($SERT^{-/-}$). No se encontraron diferencias entre los animales $SERT^{+/+}$ y aquellos con solo la mitad de la disponibilidad del transportador ($SERT^{+/-}$), excepto por la relación de intromisión en la segunda semana. Las principales diferencias significativas se encontraron en el número de eyaculaciones, donde $SERT^{+/+}$ y Los animales $SERT^{+/-}$ tuvieron un mayor número de eyaculaciones en comparación con los animales $SERT^{-/-}$ y una latencia de eyaculación más baja durante el sexto período de comportamiento sexual. Este aumento en la frecuencia y la disminución en la latencia de la eyaculación muestran que una disponibilidad completa de SERT facilita el comportamiento sexual, lo cual confirma los hallazgos anteriores (Chan et al., 2011). En la primera serie de eyaculación, el número de montas no difirió entre los genotipos y la semana de comportamiento sexual, pero la latencia de monta disminuyó con el tiempo en los animales $SERT^{-/-}$, lo que indica que el estado motivacional de estos animales estaba mejorando. Este es un resultado importante ya que este parámetro se ha considerado una medida motivacional (Ågmo, 1997, 1999). El estado de motivación para realizar el comportamiento sexual puede aumentar a medida que los animales se entrenan (efecto de aprendizaje). Tal

efecto de aprendizaje debería manifestarse en los tres genotipos. Si el nivel más bajo de comportamiento sexual en las ratas $SERT^{-/-}$ es causado por un aprendizaje más lento de la capacidad sexual, se esperaría que después de la extensa experiencia sexual, todas las ratas no difieran en su conducta sexual. Sin embargo, en todos los casos, las ratas $SERT^{-/-}$ muestran niveles sexuales significativamente más bajos que las ratas $SERT^{+/+}$ y $SERT^{+/-}$. Anteriormente hemos demostrado que cuando las ratas $SERT^{-/-}$ están expuestas a un programa de razón progresiva en un paradigma de autoadministración de cocaína, su autoadministración de esta droga es mayor en comparación con $SERT^{+/+}$ (Homberg et al., 2008), indicando poseer una mayor motivación por las propiedades de recompensa. Aunque el comportamiento sexual no es similar a la cocaína, ambos son gratificantes (Hull et al., 2006; Homberg et al., 2008) y, por lo tanto, sería interesante investigar si las diferencias en el estado de motivación sexual también están presentes en las ratas $SERT^{-/-}$ en comparación con las ratas $SERT^{+/+}$, realizando una prueba de motivación sexual incentiva no condicionada (Ågmo, 2003; Ellingsen & Ågmo, 2004). Queda por establecer si la motivación para realizar un comportamiento sexual se reduce en ratas macho $SERT^{-/-}$. El número de intromisiones aumentó para los animales $SERT^{-/-}$ a medida que la experiencia sexual progresó y se mantuvo estable para los animales $SERT^{+/-}$ y $SERT^{-/-}$; la latencia de intromisión disminuyó para todos los genotipos con el tiempo, aunque esto careció de importancia en la semana 6 para las ratas $SERT^{+/-}$. La eficiencia para copular (IR) fue baja para los animales $SERT^{+/-}$ y $SERT^{-/-}$ al comienzo de las pruebas de comportamiento sexual, pero con el tiempo la eficiencia aumentó para ambos genotipos, aunque la eficiencia solo disminuyó significativamente en la semana 6 para los animales $SERT^{+/+}$. En general, las diferencias entre los tres genotipos muestran que los animales $SERT^{-/-}$ tienen un comportamiento sexual basal más bajo que los animales $SERT^{+/+}$ y $SERT^{+/-}$ que no pueden compensarse con la experiencia sexual (efecto de aprendizaje; Olivier et al., 2011). Cuando comparamos la distribución de frecuencia de eyaculación de los diferentes genotipos ($SERT^{+/+}$

con SERT^{-/-}), es evidente que la distribución de frecuencia de eyaculación se desplaza hacia la izquierda para los animales que carecen del transportador, creando un fenotipo muy robusto y estable en estos animales.

Las diferencias en el rendimiento sexual fueron evidentes después de la segunda prueba de comportamiento sexual, en comparación con el estudio anterior de Chan et al. (2011) donde se encontraron las mismas diferencias después de la quinta semana (prueba) de comportamiento sexual y se mantuvo estable durante el resto del período de comportamiento sexual. Aunque hay un pequeño aumento en el tiempo (curva de aprendizaje), las ratas SERT^{-/-} nunca podrían alcanzar el mismo nivel de ratas SERT^{+/+} y SERT^{+/-}. Larsson (1956) investigó la influencia del aprendizaje en la expresión del comportamiento sexual, comparando animales con experiencia y animales sin experiencia. No encontró diferencias entre estos dos grupos y su conclusión fue que la experiencia sexual no determina los cambios en el comportamiento una vez que los animales han alcanzado la edad adecuada para mostrar el comportamiento sexual. En estudios anteriores de nuestro grupo de investigación, también habíamos demostrado que una vez que el comportamiento sexual se estabiliza después de la experiencia sexual, se mantiene estable con el tiempo (hasta un año; Esquivel-Franco et al., 2018). En general, estos datos reafirman el hecho de que los efectos del aumento de los niveles extracelulares de serotonina debido a la mutación en el transportador de serotonina no se pueden compensar incluso después de la experiencia sexual (Chan et al., 2011).

Se ha demostrado que los animales SERT^{-/-} tienen receptores 5-HT_{1A} menos sensibles, tanto en modelos de ratón como de rata (Homberg et al., 2007; Li et al., 1999; Olivier et al., 2008). En animales con disponibilidad completa de SERT, la administración crónica de ISRS puede causar también la desensibilización de los receptores 5-HT_{1A} (Blier & De Montigny, 1998). Como ha sido bien documentado que los receptores 5-HT_{1A} están involucrados en el comportamiento sexual (Snoeren et al., 2014; por ejemplo, los agonistas del receptor 5-HT_{1A}

estimulan el comportamiento sexual), se observa una reducción en los receptores 5HT_{1A} en ratas SERT^{-/-} (Homberg et al., 2008) podrían desempeñar un papel clave en la disminución de la función sexual que se encuentra en las ratas SERT^{-/-}. De hecho, los estudios mostraron una sensibilidad alterada del receptor 5-HT_{1A} en ratas SERT^{-/-} relacionadas con el rendimiento sexual (Chan et al., 2011). Queda por investigar si otros receptores también juegan un papel en la disminución del comportamiento sexual en ratas SERT^{-/-}.

La ausencia completa del transportador de serotonina disminuye el rendimiento basal de la eyaculación (Chan et al., 2011), lo que confirma su relevancia para la función sexual masculina normal. La falta de SERT aumenta los niveles extracelulares de serotonina, los animales sin transportadores tienen niveles 7 veces más altos de serotonina extracelular que los animales SERT^{+/+} (Olivier et al., 2008). Este aumento "crónico" de los niveles de serotonina extracelular es probablemente responsable de la menor frecuencia de eyaculación, que se asemeja y se puede comparar con la administración crónica de ISRS en ratas, mostrando efectos similares (Chan et al., 2010; de Jong et al., 2005; Olivier et al., 2011; Waldinger et al., 1998).

La disminución en la expresión del comportamiento sexual de las ratas SERT^{-/-} tiene un gran parecido con los efectos de la administración crónica de ISRS en humanos, ya que casi todos los ISRS retrasan la eyaculación y tienen fuertes efectos secundarios sexuales como disminución de la libido y la excitación (Hirschfeld, 2003; Montejo-González et al., 1997). En humanos, el tratamiento terapéutico crónico con ISRS generalmente bloquea alrededor del 80% de los transportadores de serotonina (Kugaya et al., 2003). En las ratas SERT^{+/+}, solo el 50% de los transportadores están presentes, pero la expresión del comportamiento no es significativamente diferente de la de los animales con un 100% de disponibilidad de transportadores, lo que sugiere que se necesita un umbral o disponibilidad mínima de transportadores de 5-HT para poder tener un funcionamiento sexual normal (Olivier et al., 2011). Aunque la mayoría de la administración crónica de ISRS bloquea el 80% de la SERT

(Chan et al., 2011), se ha demostrado que la administración crónica de paroxetina en ratas macho normales es capaz de obtener el 100% de la ocupación de SERT, que se puede comparar con las ratas SERT^{-/-} macho (Capello et al., 2011; Dalley, Cardinal, & Robbins, 2004; Li et al., 2017). La administración crónica de este medicamento (paroxetina, 10 mg / kg) puede inducir un efecto inhibitorio en el comportamiento sexual que es comparable al efecto encontrado en ratas macho SERT^{-/-} (Bijlsma et al., 2014).

Este estudio replica muy bien el estudio de Chan et al., realizado en 2011. Los resultados y los datos recopilados, junto con la semejanza del comportamiento sexual SERT^{-/-} de rata macho con el uso crónico de ISRS, sugieren que este animal genéticamente modificado es un modelo muy útil para estudiar la disfunción sexual inducida por ISRS (eyaculación retardada o comportamiento pro sexual disminuido). Este modelo animal también puede ser útil en el desarrollo y prueba de nuevos fármacos antidepresivos que poseen propiedades de SSRI y objetivos serotoninérgicos adicionales como la vilazodona, la vortioxetina entre otros (Li et al., 2017; Oosting et al., 2016), para comprender sus efectos y mecanismo de acción en el comportamiento sexual.

Capítulo 4

Tramadol: los efectos sobre el comportamiento sexual en ratas macho son causados principalmente por sus efectos de bloqueo de la recaptación de 5-HT

Jocelien DA Olivier^{a*}, **Diana C Esquivel-Franco**¹, Ronald Oosting², Marcel Waldinger³, Zoltan Sarnyai⁴ and Berend Olivier^{1,2,5}

1. Groningen Institute for Evolutionary Life Sciences (GELIFES), University of Groningen, Nijenborgh 7, 9747 AG Groningen, the Netherlands

2. Dept. of Psychopharmacology, Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences, Science Faculty, Utrecht University, Utrecht, the Netherlands

3. Dept. of Pharmacology & Physiology, College of Medicine, Drexel University, Philadelphia, PA, USA

4. Laboratory of Psychiatric Neuroscience, Australian Institute of Tropical Health and Medicine, James Cook University, Townsville, Australia

5. Department of Psychiatry, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA

Neuropharmacology

Resumen

El tramadol es un analgésico bien conocido y efectivo. Recientemente se demostró que el tramadol también es efectivo en el tratamiento de la eyaculación precoz humana. El efecto inhibitor del tramadol sobre la latencia de eyaculación probablemente se deba a su mecanismo de acción como agonista del receptor μ -opioide e inhibidor de la recaptura de noradrenalina / serotonina (5-HT). Para probar esta especulación, evaluamos varias dosis de tramadol en un modelo de comportamiento sexual masculino en ratas e investigamos dos tipos de drogas que interfieren con el sistema μ -opioide y el sistema 5-HT. Primero, las propiedades agonistas del receptor μ -opioide del tramadol se evaluaron con naloxona, un antagonista del receptor μ -opioide. En segundo lugar, se estudiaron los efectos de WAY100,635, un antagonista del receptor 5-HT_{1A}, sobre los efectos conductuales del tramadol. Finalmente, los efectos de la paroxetina, un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina, combinado con naloxona o el tratamiento WAY100,635, se compararon con los efectos del tramadol combinado con estos medicamentos.

Los resultados mostraron que la naloxona, a una dosis sexualmente inactiva, solo podía antagonizar parcialmente el efecto inhibitor del tramadol. Además, las dosis bajas y conductualmente inactivas de WAY100,635, disminuyeron el comportamiento sexual cuando se combinan con una dosis conductualmente inactiva de tramadol. Finalmente, demostramos que los efectos de la paroxetina en el comportamiento sexual se parecían a los efectos del tramadol, lo que indica que los efectos inhibitorios del tramadol en el comportamiento sexual son causados principalmente por sus propiedades SSRI y que su actividad agonista del receptor opioide μ solo contribuye marginalmente. Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que el tramadol ejerce inhibición de las eyaculaciones precoces en los hombres por sus propiedades inhibitoras de la recaptación de 5-HT.

Palabras clave: tramadol, comportamiento sexual masculino, ISRS, naloxona, receptor 5-HT_{1A}, eyaculación precoz.

1. Introducción

El tramadol es un fármaco de acción central y clínicamente aprobado y utilizado para el tratamiento del dolor (Shipton, 2000), es un agonista débil del receptor opioide μ , probablemente actuando a través de su metabolito activo O-desmetiltramadol (M1), que tiene una afinidad 10 veces menor por el receptor opioide μ que la morfina (Frink et al., 1996; Minami, Ogata, & Uezono, 2015). El tramadol es una mezcla racémica de dos enantiómeros activos (Frink et al., 1996). El enantiómero (+) y su metabolito ((+)-M1) son agonistas selectivos del receptor opioide μ y también tienen efectos inhibidores de la recaptación serotoninérgica (ISRS); el enantiómero (-) y el metabolito (-)-M1 son inhibidores de la recaptación de noradrenalina (Matthiesen et al., 1998). Este perfil de actividad sugiere una potencia antidepressiva demostrada en animales (Rojas-Corrales et al., 2002; 1998). Recientemente, se ha demostrado que el tramadol, como aplicación fuera de etiqueta, es eficaz en la eyaculación precoz en humanos (Eassa & El-Shazly, 2013; Yang et al., 2013), comparable a los ISRS (Waldinger et al., 1998, 2001b, 2001a; Waldinger & Olivier, 2004).

El presente estudio se realizó para investigar el posible efecto inhibitor del tramadol sobre el comportamiento sexual en ratas macho en analogía con dichos efectos con los ISRS (Bijlsma et al., 2014; Chan et al., 2008). Los ISRS tienen fuertes efectos inhibitorios sobre el comportamiento sexual tanto en humanos (Waldinger et al., 2001b, 2001a; Waldinger et al., 1998) como en roedores (Olivier et al., 2011). Estos efectos son particularmente emergentes después de la administración (sub) crónica y la mayoría de los ISRS no ejercen fuertes efectos inhibitorios sobre el comportamiento sexual después de la administración aguda en el hombre (Waldinger y Olivier, 2004) o ratas (Olivier et al., 1999; 2011; Waldinger & Olivier, 2004) aunque de manera aguda en algunas ocasiones se han reportado efectos inhibitorios (Bijlsma et al., 2014; Olivier et al., 2011). Los efectos inhibidores de la recaptación noradrenérgica generalmente no son considerados como fuertes contribuyentes a la acción inhibitoria sobre el

comportamiento sexual como se muestra con la venlafaxina y otros ISRN (Bijlsma et al., 2014; Segraves & Balon, 2014). Sin embargo, la actividad agonista del receptor opioide μ o la actividad ISRS y ISRN en la acción de la molécula podría conducir a un efecto inhibitor sexual agudo del tramadol, ya que los agonistas del receptor opioide μ como la morfina ejercen efectos inhibitorios agudos sobre el comportamiento sexual masculino en ratas (Ågmo & Paredes, 1988; McIntosh, Vallano, & Barfield, 1980). En los presentes estudios, primero exploramos varias dosis de tramadol (10, 12.5, 20, 25, 40 y 50 mg/kg IP, experimentos 1 y 6) sobre el comportamiento sexual de ratas macho seleccionadas y entrenadas para la actividad sexual promedio (2-3 eyaculaciones por prueba de 30 minutos al final del entrenamiento). Debido a que solo la dosis más alta de tramadol (50 mg/kg) redujo el comportamiento sexual, intentamos antagonizar estos efectos inhibitorios con naloxona, un antagonista del receptor de opiáceos (experimentos 2, 3 y 4). En otro conjunto de estudios, seleccionamos una dosis no inhibitoria del comportamiento sexual de tramadol (25 mg/kg) y la combinamos con una dosis seleccionada inactiva del comportamiento sexual del antagonista del receptor 5-HT_{1A} WAY100,635 (experimento 5). La idea detrás de este experimento se basó en nuestro hallazgo anterior de que la combinación de dosis sexualmente inactivas de un antagonista del receptor 5-HT_{1A} con una dosis sexualmente inactiva de un ISRS después de la administración aguda inhibe fuertemente el comportamiento sexual (de Jong, et al., 2005; Olivier, 2015). Como comparación, también realizamos un estudio de combinación aguda de la paroxetina ISRS y WAY100,635 (experimento 7).

2. Materiales y métodos

2.1 Animales

Ciento veinte ratas macho de la cepa Wistar (Harlan, Zeist, Países Bajos) con un rango de 450-500 g fueron entrenados para el comportamiento sexual con ratas hembra gonadalmente

intactas, para inducir receptividad sexual se les administro benzoato de estradiol (50 µg de benzoato de estradiol en aceite de sésamo saturado con lecitina administrado 36 horas antes de la prueba), una vez a la semana durante 4 semanas en pruebas de entrenamiento sexual de 30 minutos. El entrenamiento y la prueba sexual se realizaron bajo condiciones de luz roja y luz oscura invertida (12h luz-12hobscuridad: luces apagadas de 6:00 a.m. a 6:00 p.m.) en arenas de conducta sexual (60cmx 40cmx30cm; cajas de plástico rectangulares con ventana frontal transparente y material de cama regular). La cama de las cámaras de prueba sexual no se cambió durante el entrenamiento y las pruebas, para estimular el comportamiento sexual debido al olor de las feromonas. Todas las pruebas se realizaron entre las 9 a.m. y las 4 p.m. Después de 4 pruebas de entrenamiento (30 min / entrenamiento), las ratas macho fueron consideradas sexualmente entrenadas y clasificadas en 3 grupos: eyaculación promedio (2-3 eyaculaciones (E)/prueba), eyaculación rápida (> 3 E/prueba) y eyaculación lenta (0 -1 E/prueba); grupos basados en los números de eyaculación por prueba (Chan et al., 2008; de Jong et al., 2005; Olivier et al., 2006). Se seleccionaron y utilizaron un total de 48 ratas con un número promedio de eyaculaciones durante todos los experimentos posteriores. En todos los experimentos individuales se usaron al menos N = 8 ratas por dosis de un fármaco y las ratas se usaron un máximo de una vez por semana para garantizar un lavado suficiente de los fármacos. Las ratas tenían acceso a comida y agua *ad libitum*. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las pautas gubernamentales para el cuidado y uso de animales de laboratorio y fueron aprobados por el Comité Ético para la Investigación Animal de las Facultades de Medicina Veterinaria, Ciencias Farmacéuticas, Química y Biología de la Universidad de Utrecht. Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar la cantidad de animales y su sufrimiento.

2.2 Tratamiento farmacológico y experimentos conductuales

Se tuvo cuidado de que los animales no recibieran las mismas drogas o vehículo durante el experimento. Para las pruebas farmacológicas, a las ratas macho se les dio un tiempo de

habituaación de 30 minutos en las cámaras de prueba. Todos los fármacos fueron inyectados IP 30 minutos antes de la introducción de la rata hembra. Todas las pruebas se realizaron entre las 9:00 a.m. y las 16:00 p.m. Las observaciones de comportamiento que ocurrieron durante 30 minutos después de la introducción de la hembra se analizaron utilizando Noldus Observer® (Noldus Information Technology, Wageningen, Países Bajos). A partir de estos datos, se registraron los siguientes parámetros de la primera serie de eyaculación (Chan et al., 2011): número de eyaculaciones/prueba (E), latencia (s) a la primera monta (ML), latencia (s) a la primera intromisión (IL), número de montas (M), número de intromisiones (I) y latencia (s) a la primera eyaculación (EL). Después de la eyaculación, se calculó la latencia posterior a la eyaculación (PEL), utilizando el tiempo desde la primera eyaculación y el tiempo de la primera monta/intromisión (lo que ocurriera primero) de la segunda serie de eyaculación. La eficiencia copulatoria (CE) se calculó como: $CE = (\#I / (\#I + \#M)) * 100\%$. CE también se usa con frecuencia como Relación de Intromisión (IR). En el presente estudio, los principales resultados se deducen de los efectos del tratamiento (vehículo o dosis de un medicamento) en la primera serie de eyaculación, que incluye la primera latencia post eyaculatoria. Para estudiar los fármacos, es importante tener una farmacodinámica y una cinética comparables, por lo que se elige una duración de prueba fija de 30 minutos (1800 segundos). Debido a que algunos tratamientos causan bajas en la actividad sexual (por ejemplo, cero eyaculaciones), algunos animales no pueden usarse para estadísticas. Se utilizan los valores máximos artificiales de 1800 segundos (es decir, la duración de la prueba) para las latencias (latencia de eyaculación, latencia de monta e intromisión, latencia post eyaculatoria), aunque esto es ciertamente un tema de disputa. Los datos de monta e intromisión de estos animales que no eyaculan también son problemáticos porque se desconoce si una rata eventualmente puede eyacular. Estos datos pueden considerarse artificiales y son cuestionables para análisis estadísticos. En algunos experimentos en los que el fármaco inhibió la eyaculación, pocos o ningún animal eyacularon

una segunda vez, lo que imposibilita el análisis estadístico de la segunda serie de eyaculación. ML, IL y PEL y también incluyen los valores de frecuencia (MF, IF) para todos los animales con fines estadísticos. En tales casos, los fuertes efectos inhibitorios del fármaco justifican el uso de estos valores. Elegimos omitir los análisis estadísticos si menos del 50% de los animales en un determinado grupo tratado con los fármacos no presentó parámetros de la serie eyaculatoria. Todas las tablas solo muestran los resultados de la primera serie eyaculatoria. Los detalles de un determinado experimento se describen en las leyendas de las tablas respectivas.

2.3 Análisis estadísticos

Los datos tuvieron una distribución normal y homogeneidad de varianza; se separaron en series de eyaculaciones. Se utilizó el análisis estadístico ANOVA de una vía y *post-hoc* Bonferroni para analizar los datos. Todos los datos fueron analizados con el software SPSS 16.0 (tecnologías LEAD, Chicago, EE. UU.). El nivel de significancia se estableció en $p < 0.05$. Los datos se expresan como media \pm SEM.

2.4 Fármacos

El clorhidrato de tramadol (obtenido de DMI, Reino Unido, con vida media de 6 horas), el clorhidrato de naloxona (vida media de 90 minutos) y el maleato WAY100,635 (vida media 2-4 horas) se compraron de Sigma-Aldrich. El hidrocloreuro de paroxetina (Farmacia, UMCG Groningen, Países Bajos; vida media 21 horas) se preparó a partir de tabletas (20 mg) obtenidas de una farmacia local, molidas y suspendidas en solución salina. Tenemos amplia evidencia de que la paroxetina utilizada de esta manera tiene una excelente biodisponibilidad que es comparable a la de la sal hidrocloreuro de paroxetina sola (Bijlsma et al., 2014; Chan et al., 2008). Todos los medicamentos se disolvieron en NaCl al 0.9% (solución salina), y cada solución se preparó cada mañana para cada día de prueba. Todos los fármacos fueron administrados IP.

2.5 Estudios farmacológicos:

Se realizaron los siguientes estudios:

Estudio 1: 48 ratas macho eyaculadoras promedio seleccionadas se dividieron aleatoriamente en 4 grupos de N=12 cada uno. Los grupos recibieron vehículo (solución salina), 10, 20 o 40 mg/kg de tramadol (clorhidrato de tramadol). Debido a que físicamente no pudimos evaluar 48 animales en un día de prueba, realizamos pruebas durante dos días consecutivos y los animales y el tratamiento fueron aleatorizados durante estos dos días. En los siguientes experimentos (estudios 2-6) se utilizó un número menor de animales. Fueron elegidos al azar de las 48 ratas disponibles con la restricción de que los animales nunca recibieron el mismo tratamiento más de una vez y los 48 animales se sometieron a aproximadamente el mismo número de pruebas experimentales.

Estudio 2: 24 animales fueron tratados con vehículo + solución salina (N=8), vehículo + tramadol (50 mg/kg; N = 8) y un grupo con naloxona (10 mg/kg + tramadol 50 mg/kg; N=8). Las pruebas se realizaron durante un mismo día.

Estudio 3: 32 ratas fueron tratadas con vehículo + vehículo (N=8), vehículo + 5 mg/kg de naloxona (N=8), vehículo + naloxona (10 mg/kg; N=8) y vehículo + paroxetina (10 mg/kg; N=8). Las pruebas se realizaron durante un mismo día.

Estudio 4: 24 ratas fueron tratadas con vehículo (vehículo + vehículo; N=8), vehículo + naloxona (20 mg/kg; N = 8) o tramadol (50 mg/kg) + naloxona (20 mg/kg; N=8). Las pruebas se realizaron durante un mismo día.

Estudio 5: 24 ratas fueron tratadas con vehículo + vehículo (N=8), WAY100,635 (1 mg/kg) + vehículo (N=8) o WAY100,635 (1 mg/kg) + tramadol (25 mg/kg; N=8). Las pruebas se realizaron durante un mismo día **Estudio 6:** 24 ratas fueron tratadas con vehículo (N=8),

tramadol (12.5 mg/kg; N=8) o tramadol (25 mg/kg; N=8). Las pruebas se realizaron durante un mismo día.

Estudio 7: las 48 ratas fueron tratadas con vehículo + vehículo (N=8), vehículo + WAY100,635 (0.1 mg/kg; N=8), vehículo + WAY100,635 (0.3 mg/kg; N=8), vehículo + paroxetina (10 mg/kg; N=8), WAY100,635 (0.1 mg/kg) + paroxetina (10 mg/kg; N=8) o WAY100,635 (0.3 mg/kg) + paroxetina (10 mg/kg; N=8) Este experimento se realizó durante dos días consecutivos (como en el estudio 1).

3. Resultados

3.1 Estudio de dosis-respuesta de tramadol

En el primer estudio de dosis-respuesta (0, 10, 20 y 40 mg/kg), el tramadol no tuvo efectos significativos sobre ningún aspecto del comportamiento sexual masculino (Figura 1 / Tabla Supl. 1). Por lo tanto, decidimos usar una dosis más alta de tramadol en el próximo experimento. Por lo que se utilizó la dosis de 50 mg/kg de tramadol vs vehículo (Figura 2 / Tabla Supl. 2), el tramadol redujo drásticamente el comportamiento sexual. La mayoría de los animales se abstuvieron de cualquier actividad sexual, lo que se ve claramente por la ausencia de eyaculación, latencias prolongadas antes de la primera monta e intromisión en un número limitado de animales.

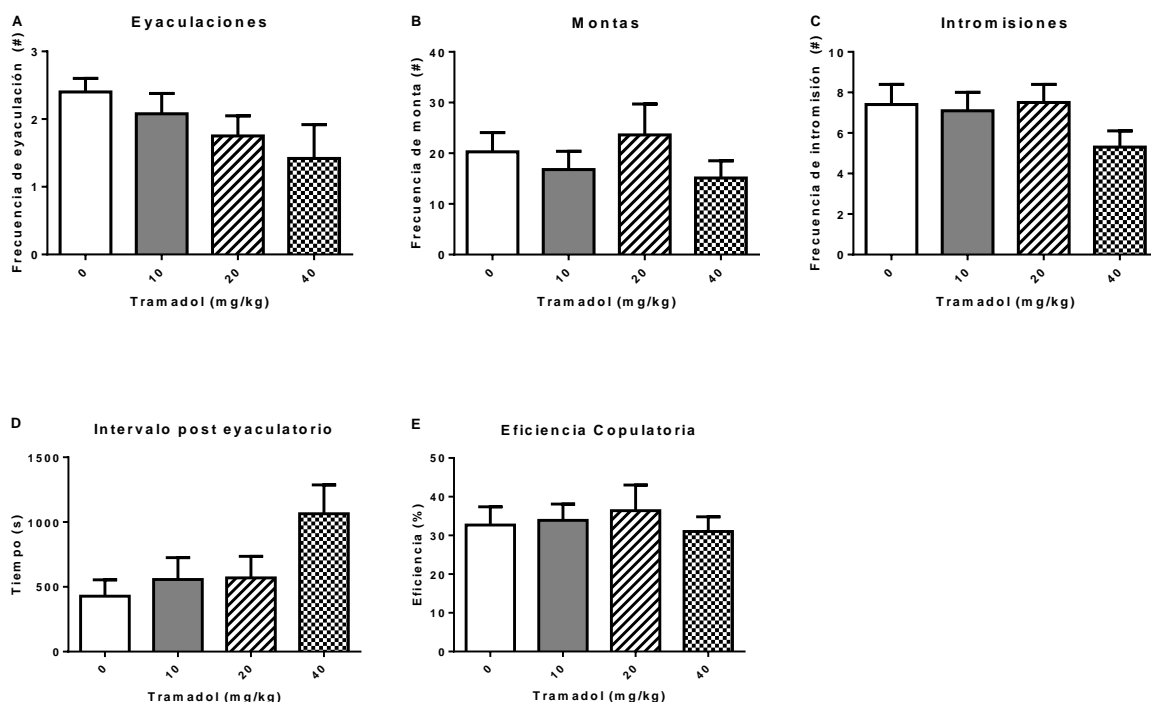


Figura 1: Comportamiento sexual de ratas macho (N=12/grupo) tratadas con vehículo, 10, 20 ó 40 mg/kg de tramadol. Los datos se representan como media + SEM. Se proporciona el número de eyaculaciones por 30 min (A), número de montas (B), intromisiones (C), intervalo post eyaculatorio (D) y eficiencia copulatoria (E) de la primera serie de eyaculación. Los análisis estadísticos detallados (ANOVA) se muestran en la Tabla Supl.1.

3.2 Antagonismo de los efectos sexuales del tramadol por la naloxona.

La naloxona (5 y 10 mg/kg: Tabla Supl. 3) no tuvo efectos significativos sobre el comportamiento sexual. La dosis de 10 mg/kg de naloxona tuvo un efecto antagonista parcial muy limitado sobre los efectos inhibitorios de 50 mg/kg de tramadol (Figura 2, Tabla Supl. 2). La latencia de la primera monta (M_1) y la primera intromisión (L_1) fueron significativamente más cortas después de agregar naloxona al tramadol que después del tramadol solo. Además, el número total de montas (M) e intromisiones (I) incrementaron significativamente.

Un intento de antagonizar aún más el efecto inhibitor del tramadol al aumentar la dosis de naloxona a 20 mg/kg fracasó, porque esa dosis de naloxona por si misma inhibió fuertemente el comportamiento sexual (Figura 3, Tabla Supl.4) y tampoco fue capaz de antagonizar los efectos de la dosis de 50 mg/kg del tramadol.

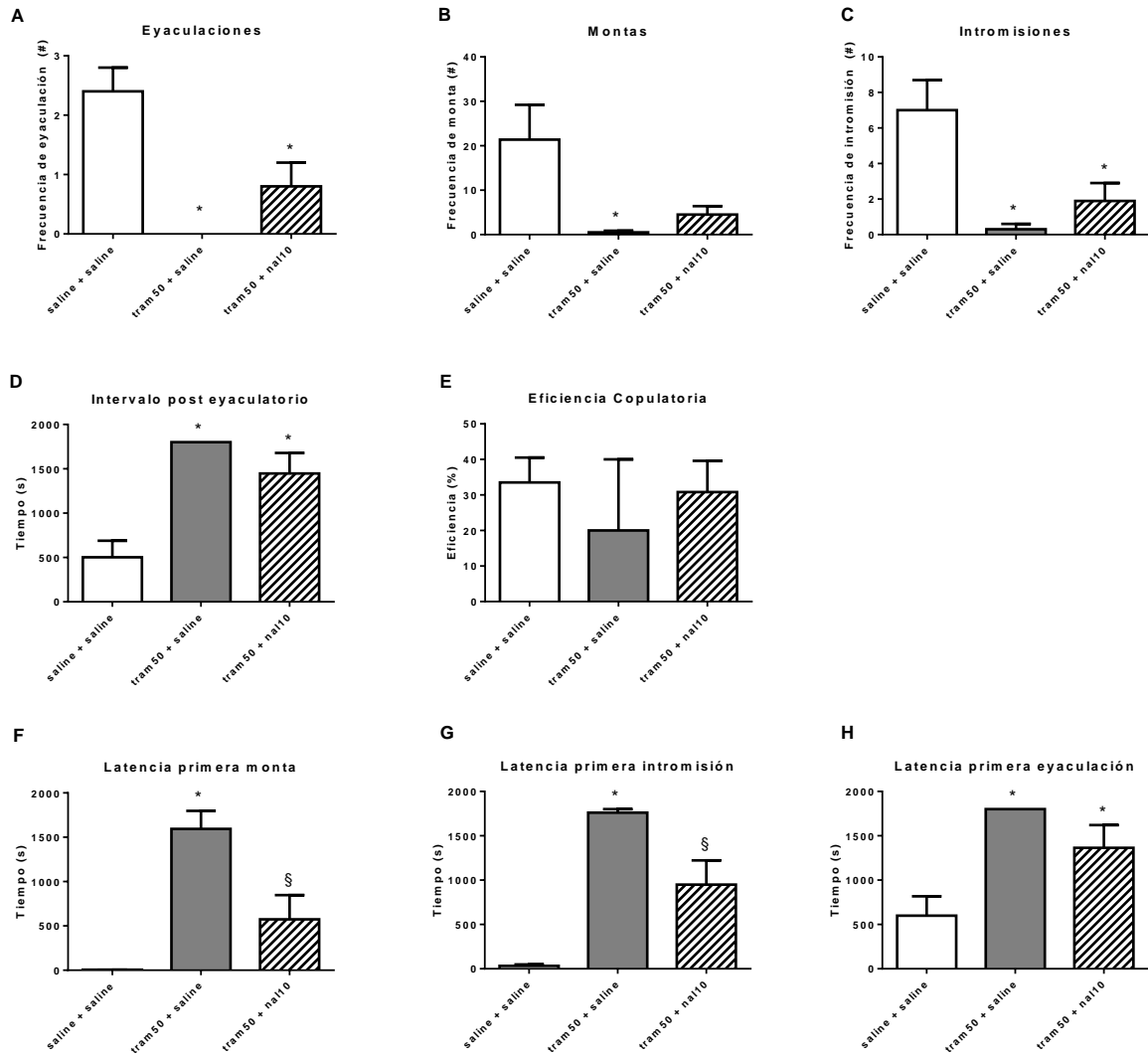


Figura 2: Comportamiento sexual de ratas macho (N=8/grupo) tratadas con solución salina + solución salina, tramadol 50 mg/kg + solución salina o tramadol 50 mg/kg + naloxona 10 mg/kg. Los datos se dan como media + SEM. Se muestran el número de eyaculaciones por 30 min (A), número de montas (B), intromisiones (C), intervalo post eyaculatorio (D), eficiencia copulatoria (E), latencia a la primera monta (F), latencia a la primera intromisión (G) y la latencia a la primera eyaculación (H) de la primera serie de eyaculación. Los análisis estadísticos detallados (ANOVA) se muestran en la Tabla Supl. 2. *: diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación con el grupo vehículo + solución salina. §: diferencia significativa entre el grupo tramadol + solución salina y el grupo tramadol + naloxona ($p < 0.05$).

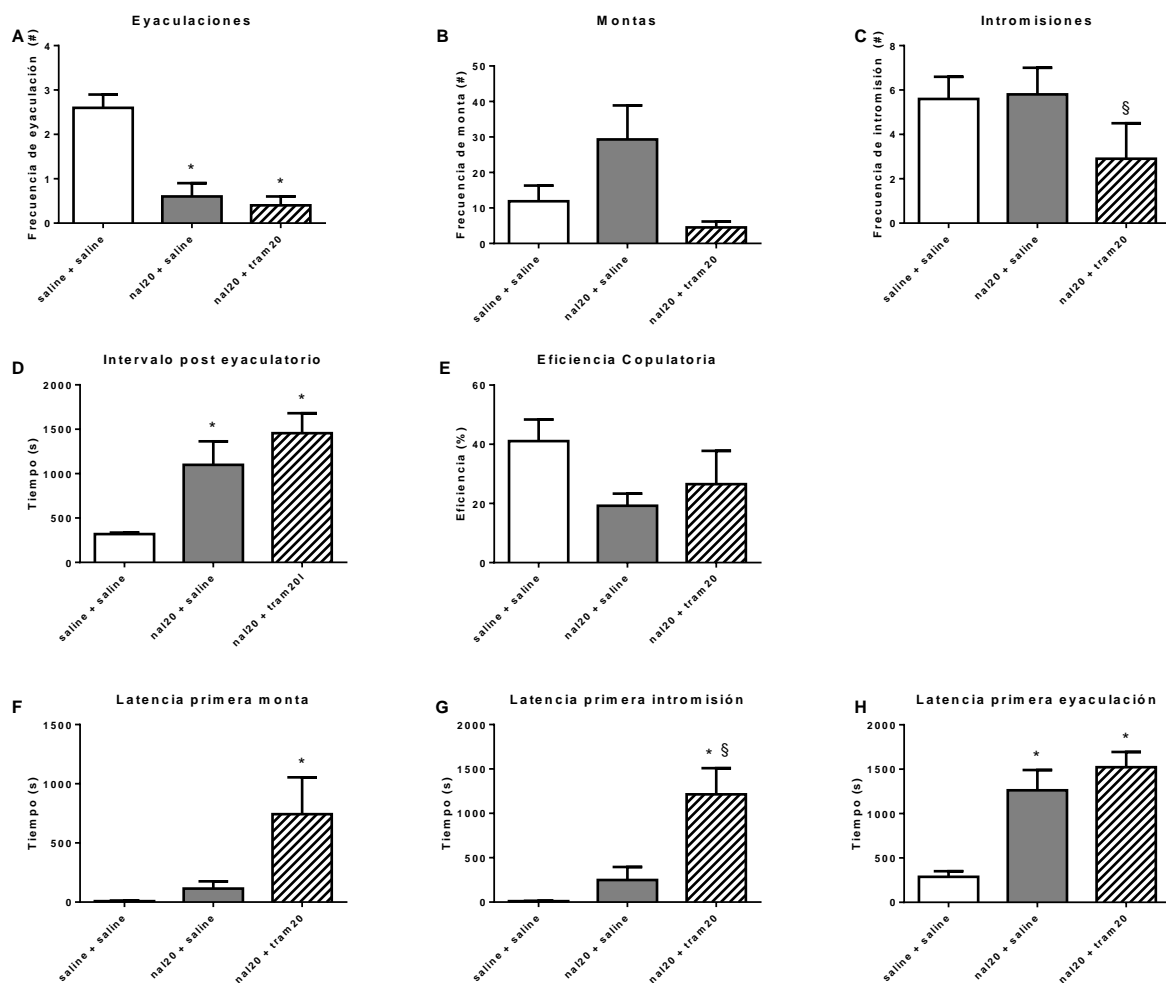


Figura 3: Comportamiento sexual de ratas macho (N=8/grupo) tratadas con solución salina + solución salina, naloxona 20 mg/kg + solución salina o tramadol 50 mg/kg + naloxona 20 mg/kg. Los datos se representan como media + SEM. Se muestran: el número de eyacuaciones por 30 min (A), número de montas (B), intromisiones (C), intervalo post eyaculatorio (D), eficiencia copulatoria (E), latencia a la primera monta (F), latencia a la primera intromisión (G) y la latencia a la primera eyacuación (H) de la primera serie de eyacuación. Los análisis estadísticos detallados (ANOVA) se muestran en la Tabla Supl. 4. *: diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación el grupo sol. salina + sol. salina. §: diferencia significativa entre el grupo de naloxona + solución salina y el grupo de tramadol + naloxona ($p < 0.05$).

3.2 Combinación de tramadol y paroxetina con el antagonista del receptor 5-HT_{1A} WAY100,635.

La paroxetina (10 mg/kg IP) por sí sola no tiene un efecto inhibitor constante sobre el comportamiento sexual cuando se administra de forma aguda (Tabla Supl. 3 (última columna) y Tabla supl. 7). Pero, cuando esta dosis se combinó con, dosis inactivas del antagonista del receptor 5-HT_{1A} WAY100,635. (1.0 mg/kg (Figura4, Tabla supl.5); 0.1 y 0.3 mg/kg (Figura 5;

Tabla supl. 7)) el comportamiento sexual se inhibió fuertemente (Figura 4 y 5 y Tablas Supl.5 y 7).

Cuando 1.0 mg/kg WAY100,635, que por sí solo, no tiene ningún efecto sobre el comportamiento sexual (Fig. 4 y Tabla Supl.5), se combinó con una dosis de tramadol (25 mg/kg) que por sí misma no tuvo un efecto significativo sobre comportamiento sexual (tabla supl.6), el comportamiento sexual se redujo severamente (Fig. 4; Tabla Supl. 5)

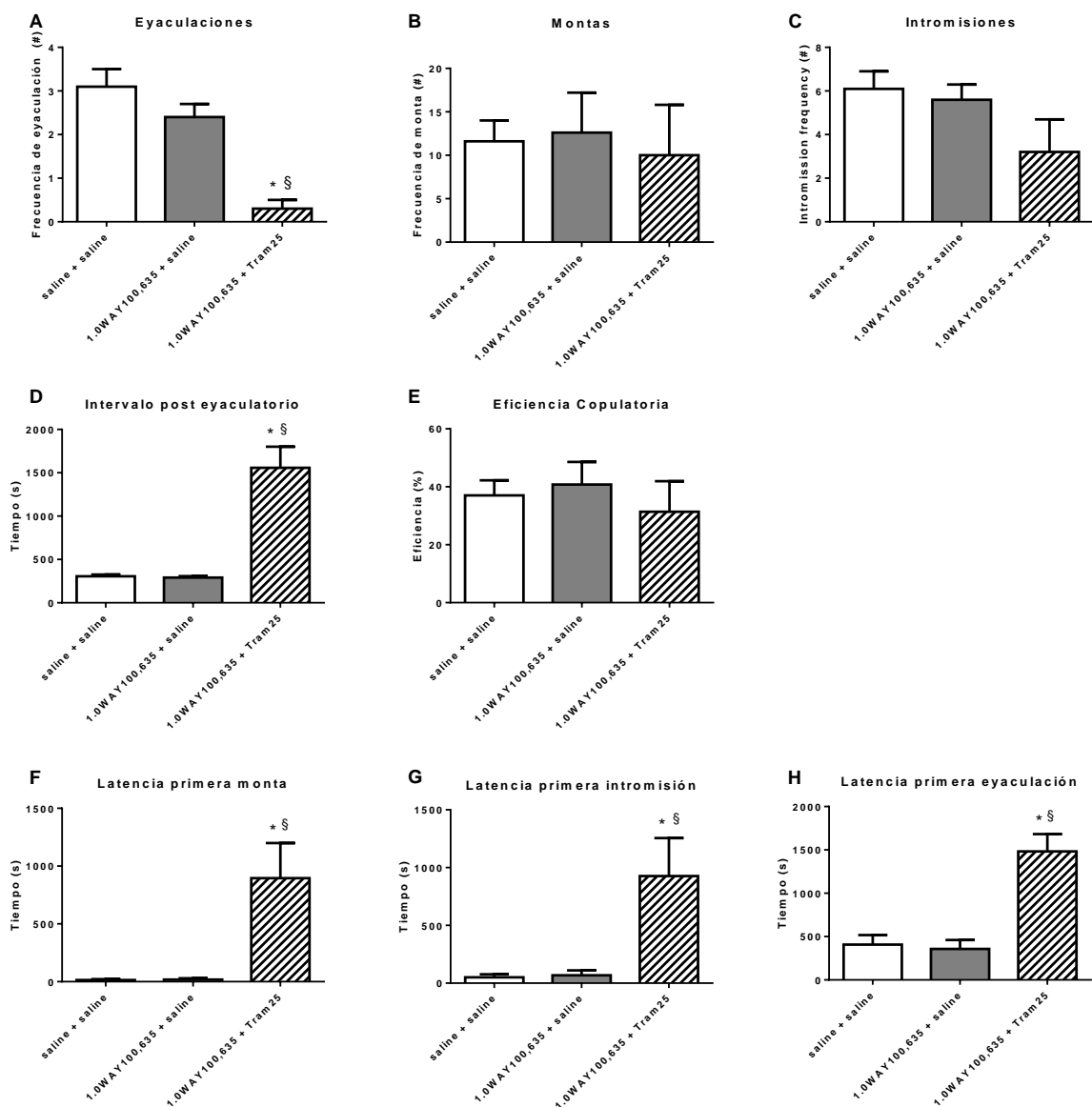


Figura 4: Comportamiento sexual de ratas macho (N=8/grupo) tratadas con solución salina + solución salina, WAY100,635 1 mg/kg + solución salina, o tramadol 25 mg/kg + WAY100,635 1 mg/kg. Los datos se dan como media + SEM. Se muestran: el número de eyaculaciones por 30 min (A), número de montas (B), intromisiones (C), intervalo post eyaculatorio (D), eficiencia copulatoria (E), latencia a la primera monta (F), latencia a la primera intromisión (G) y la latencia a la primera eyaculación (H) de la primera serie de eyaculación. Los análisis estadísticos detallados (ANOVA) se muestran en la Tabla Supl. 5. *: diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación con solución salina + solución salina. §: diferencia significativa entre WAY100,635 + solución salina, y tramadol + WAY100,635 grupo ($p < 0.05$).

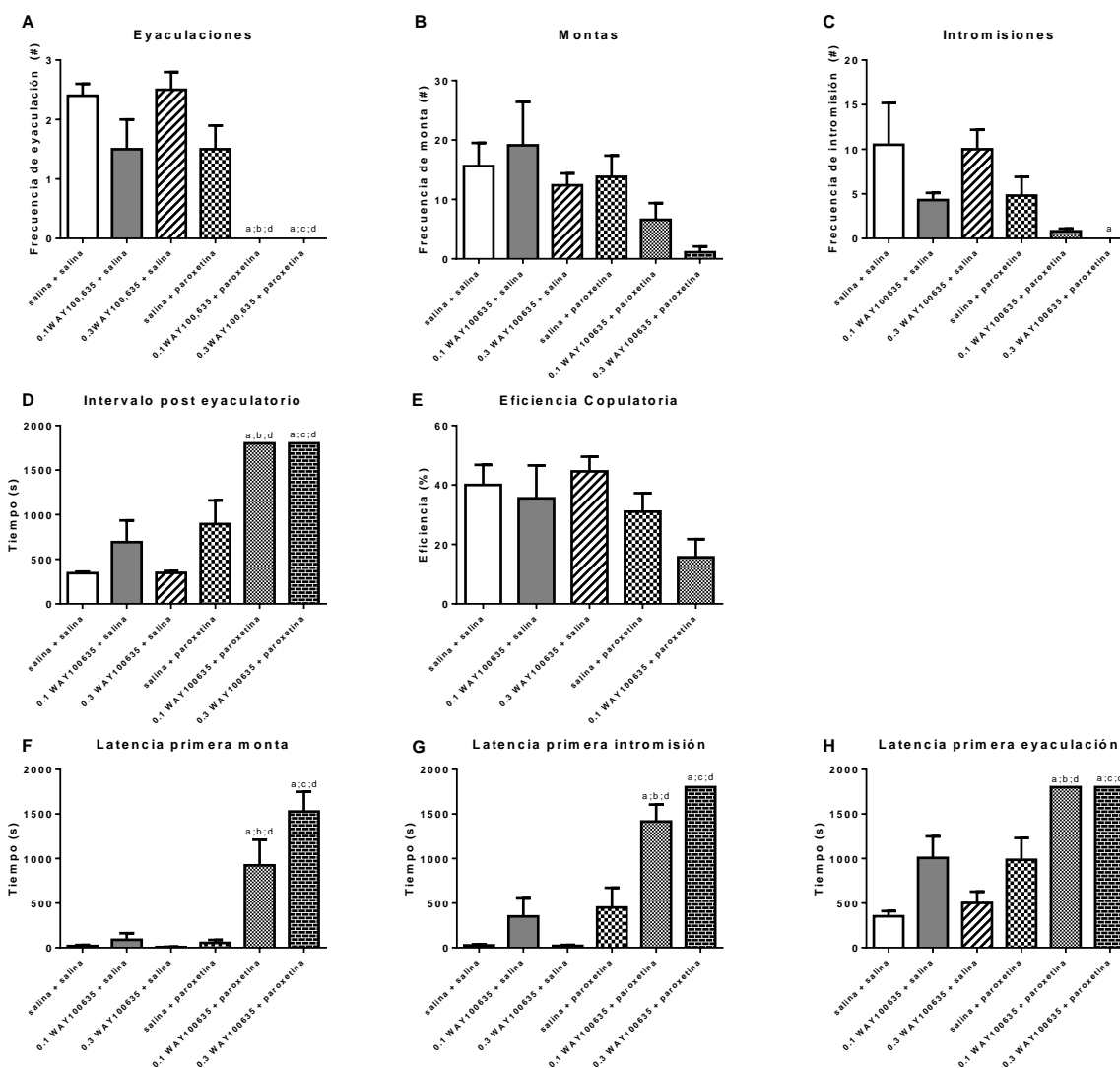


Figura 5: Comportamiento sexual de ratas macho (N=8/grupo) tratadas con solución salina + solución salina, WAY100,635 (0.1 mg/kg) + solución salina, WAY100,635 (0.3 mg/kg) + solución salina, solución salina + paroxetina (10 mg/kg), WAY100,635 (0.1 mg/kg) + paroxetina (10 mg/kg) y WAY100,635 (0.3 mg/kg) + paroxetina (10 mg/kg). Los datos se dan como media + SEM. Se muestran: el número de eyaculaciones por 30 min (A), número de montas (B), intromisiones (C), intervalo post eyaculatorio (D), eficiencia copulatoria (E), latencia a la primera monta (F), Latencia a la primera intromisión (G) y la latencia a la primera eyaculación (H) de la primera serie de eyaculación. Los análisis estadísticos detallados (ANOVA) se muestran en la Tabla Supl.7. a: diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación con solución salina + solución salina. b: diferencia significativa en comparación con WAY100,365 (0.1 mg/kg) + solución salina ($p < 0.05$). c: diferencia significativa en comparación con WAY100,635 (0.3 mg/kg) + solución salina. d: diferencia significativa en comparación con el grupo solución salina + paroxetina (10 mg/kg).

4. Discusión

El tramadol, administrado de forma aguda, no tiene hasta la dosis de 40 mg/kg (IP) efectos significativos sobre el comportamiento sexual de ratas macho que eyaculan de manera “normal”, aunque se observaron algunas tendencias inhibitorias con la dosis de 40 mg/kg. Sin embargo, a la dosis de 50 mg/kg IP, el tramadol inhibió fuertemente el comportamiento sexual, reduciéndolo casi a cero. Debido a que el tramadol, a través de sus enantiómeros y metabolitos activos, ejerce efectos agonistas del receptor de opiáceos y la inhibición de la recaptación de 5-HT, se intentó descifrar si los efectos del tramadol sobre el comportamiento sexual estaban relacionados con alguno de estos mecanismos. La naloxona, un antagonista del receptor de opiáceos μ no mostró a dosis bajas (5 y 10 mg/kg) efectos intrínsecos sobre el comportamiento sexual. Sin embargo, a 20 mg/kg, la naloxona inhibió fuertemente el comportamiento sexual por si sola, haciendo que esta dosis no sea adecuada para tratar de antagonizar los efectos inhibitorios del tramadol. La naloxona (10 mg/kg) tuvo algunos efectos antagonistas sobre los efectos inhibitorios del tramadol a la dosis de 50 mg/kg, lo que sugiere que el receptor opioide μ puede desempeñar un papel menor en este efecto. La morfina, un agonista del receptor de opiáceos μ inhibe el comportamiento sexual masculino en ratas (A Ágmo & Paredes, 1988; McIntosh et al., 1980), un efecto que podría ser completamente antagonizado por la naloxona. Aunque los efectos intrínsecos de la naloxona en el comportamiento sexual masculino son controvertidos (Gessa, Paglietti, & Quarantotti, 1979; McIntosh et al., 1980; Myers & Baum, 1979), en nuestras manos dosis de 5 y 10 mg/kg son conductualmente silenciosas, mientras que la dosis de 20 mg/kg parecía inhibitoria. La curva dosis-respuesta de tramadol muestra una fuerte disminución en el comportamiento sexual entre las dosis de 40 y 50 mg/kg. Aunque parte de esta inhibición se debe al bloqueo del receptor opioide μ , el antagonismo de este efecto por la naloxona no puede superar por completo la inhibición del comportamiento sexual inducida por el tramadol. Los efectos inhibitorios restantes pueden deberse a efectos de ISRS más fuertes a la dosis de 50 mg/kg u otros efectos ejercidos por el tramadol a dosis más altas, v.g. la

inhibición de la recaptación de noradrenalina u otros mecanismos (ver Minami et al., 2015). Se postula que la acción inhibitoria potencial de los ISRS sobre el comportamiento sexual puede estar mediada por los receptores 5-HT_{1A} (de Jong et al., 2005; Olivier et al., 2011). El bloqueo de este receptor en presencia de un ISRS inhibe fuertemente (y depende de la dosis) el comportamiento sexual, incluso a dosis del ISRS (10 mg/kg de paroxetina IP) que no ejercen de manera aguda actividad inhibitoria intrínseca. WAY100,635, un antagonista potente y selectivo del receptor 5-HT_{1A} no tiene actividad intrínseca en el comportamiento sexual, pero disminuye fuertemente las actividades sexuales cuando se combina (a dosis de 0.1, 0.3 y 1 mg/kg) con paroxetina de 10 mg/kg. Cuando el tramadol, a una dosis seleccionada (25 mg/kg IP) que por sí sola no afecta el comportamiento sexual, se combina con una dosis seleccionada (1 mg/kg IP) de WAY100,635, se encuentra una fuerte reducción en el comportamiento sexual, apoyando el papel del mecanismo inhibidor de la recaptación de 5-HT del tramadol en su efecto inhibitorio en el comportamiento sexual. Los estudios de discriminación de drogas en ratas (Filip et al., 2004), donde se entrenó una dosis de 20 mg/kg (IP) de tramadol como estímulo discriminatorio (SD) versus solución salina, respaldaron un papel para el mecanismo de opiáceos en tramadol, porque la morfina (2 mg/kg) sustituyó completamente la señal de tramadol, mientras que el SD podría ser completamente antagonizado por la naloxona a dosis bastante bajas (DE₅₀ alrededor de 0.2 mg/kg). Sorprendentemente, ni la noradrenalina (NRI), la serotonina (SSRI) ni los bloqueadores de recaptación de NE/5-HT mezclados (SNRI) pudieron sustituir el SD de tramadol (como lo hizo la morfina), mientras que los NRI, pero no los ISRS, pudieron cambiar la curva de dosis-respuesta a la izquierda. Está bien documentado que los ISRS son notoriamente difíciles de entrenar para ser utilizados como estímulo discriminatorio en ratas (normales) (Berend Olivier, 2015), mientras que los NRI crean señales entrenables (Caldarone et al., 2010; Dekeyne et al., 2001). El tramadol, a través de su (-)-enantiómero y (-)-metabolito, tiene efectos inhibidores de la recaptación de noradrenalina que

pueden contribuir a sus efectos inhibitorios sexuales a dosis más altas. En general, los NRI (por ejemplo, reboxetina, milnacepram) no se conocen como antidepresivos con fuertes efectos secundarios sexuales (Graf et al., 2014; Segraves & Balon, 2014). La mejora de la neurotransmisión de NE podría incluso antagonizar funcionalmente las acciones inhibitorias de los ISRS en el comportamiento sexual (Bijlsma et al., 2014). Con base en nuestros datos, postulamos que el componente SSRI en tramadol es el principal responsable de la acción inhibitoria sobre el comportamiento sexual, mientras que los efectos agonistas μ -opioides podrían (ligeramente) contribuir a este efecto.

A partir de estos hallazgos, se predice que el tramadol, a dosis que inhiben el comportamiento no sexual después de la administración aguda, ejercerá efectos inhibitorios después de la dosificación (sub) crónica, en analogía con las propiedades de los ISRS (Chan et al., 2008). Aún no está claro si las propiedades agonistas del receptor opioide μ del tramadol contribuyen significativamente a estos efectos, por lo que se necesitaría más estudios. La prueba de tramadol en el comportamiento sexual en ratas noqueadas a SERT determinará si la actividad agonista opioide en tramadol ejerce efectos inhibitorios sexuales en ausencia de los efectos inhibidores de SERT del tramadol.

El componente ISRS del tramadol solo parece suficiente (en comparación con la paroxetina) para explicar los efectos inhibitorios del tramadol sobre el comportamiento sexual en humanos con eyaculación precoz (Eassa & El-Shazly, 2013; Yang et al., 2013). Aunque nuestros datos sugieren que el componente opioide μ en tramadol podría contribuir a este efecto, la pregunta sigue siendo qué significa esto en la práctica clínica. Los datos en humanos indican que no existen efectos claros del tratamiento "a demanda" del tramadol, aunque los estudios realizados hasta la fecha no han examinado de manera metódica ese aspecto.

5. Conclusiones

Los resultados indican que los efectos inhibidores sexuales del tramadol después de la administración aguda y dosis relativamente altas están mediados principalmente por el componente ISRS del tramadol, aunque un pequeño efecto del mecanismo agonista de opioides μ podría contribuir a este efecto inhibitor. Como tal, el tramadol podría ser un buen candidato para el tratamiento de la EP en hombres, aunque los efectos secundarios podrían ser más extensos o diferentes de los ISRS solos.

Datos Suplementarios

Tabla Supl. 1: Efectos del tramadol sobre el comportamiento sexual de ratas macho de la cepa Wistar. N=12/grupo.

Dosis de tramadol, mg/kg	0 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg	40 mg/kg	ANOVA significancia
Parámetros medidos	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	
# E	2.4±0.2	2.08±0.3	1.75±0.3	1.42±0.5	F(3,44)=2.222; P=0.178
Latencia 1ª M (s)	26.1±13.3	7.46±2.1	55.4±145.2	43.2±10.6	F(3,44)=0.848; P=0.475
Latencia 1ª I (s)	46.5±25.6	62.0±19.4	76.9±116.5	231.3±124.4	F(3,44)=1.633; P=0.189
# M 1ª serie	20.3±3.8	16.8±3.6	23.6±6.1	15.1±3.4	F(3,44)=0.739; P=0.534
# I 1ª serie	7.4±1.0	7.1±0.9	7.5±0.9	5.3±0.8	F(3,44)=1.269; P=0.297
Latencia 1ª E (s)	541.9±126.9	642.7±166.5	873.1±170.7	1020.4±210.3	F(3,44)=1.610; P=0.201
PEL ₁	428.5±125.7	557.4±167.9	569.4±166.3	1064.8±221.7	F(3,44)=2.606; P=0.064
IR ₁	32.7±4.7	33.9±4.2	36.4±6.6	31.0±3.8	F(3,44)=0.204; P=0.893

M=Monta; I= Intromisión; E=Eyaculación; PEL=Intervalo post eyaculatorio; # =número; IR= Relación de intromisión = [# intromisiones / (# intromisiones + # montas)]*100

Tabla Supl. 2: Efectos de tramadol y naloxona en el comportamiento sexual de ratas macho de la cepa Wistar. N=8 /group.

Dosis de tramadol, mg/kg	0 mg/kg + 0 mg/kg A	50 mg/kg + Salina B	50 mg/kg + 10mg/kg Naloxona C	ANOVA significancia
Parámetros medidos	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	
# E	2.4±0.4	0.0±0.0*	0.8±0.4*	F(2,21)=12.781; P<0.001
Latencia 1ª M (s)	5.2±1.1	1593.7±203.1*	574.4±272.9 (bc)	F(2,21)=16.789; P<0.001
Latencia 1ª I (s)	32.7±16.4	1760.2±39.8*	948.4±273.3* (bc)	F(2,21)=29.284; P<0.001
# M 1ª serie	21.4±7.8	0.5±0.4*	4.5±1.9	F(2,21)=5.767; P=0.010
# I 1ª serie	7.0±1.7	0.3±0.3*	1.9±1.0*	F(2,21)=9.637; P=0.001
Latencia 1ª E (s)	598.9±217.8	1800±0.0*	1364.4±256.8*	F(2,21)=9.782; P=0.001
PEL ₁	502.9±186.1	1800±0.0*	1447.5±231.1*	F(2,21)=15.327; P<0.001
IR ₁	33.5±7.0	20.0±20.0 (n=2)	30.8±8.8 (n=6)	F(2,13)=0.320; P=0.732

M=Monta; I= Intromisión; E=Eyacuación; PEL=Intervalo post eyaculatorio; # =número; IR= Relación de intromisión = [# intromisiones / (# intromisiones + # montas)]*100

* = Significativamente diferente de 0 mg/kg (p <0.05).

(bc) = significativamente diferente (p <0.05) entre 50 mg/kg + solución salina (B) y 50 mg/kg + 10 mg/kg Naloxona (C).

Tabla Supl. 3: Efectos de la naloxona y la paroxetina en el comportamiento sexual de ratas machos de la cepa Wistar. N=8 animales/grupo.

Dosis de fármaco, mg/kg	0 mg/kg (salina + salina)	5 mg/kg Naloxona + Salina	10 mg/kg Naloxona + Salina	10 mg/kg Paroxetina + salina	ANOVA significancia
Parámetros medidos	Media± SEM	Media± SEM	Media± SEM	Media± SEM	
# E	1.0±0.5	1.3±0.6	2.3±0.7	1.0±0.5	F(3,28)=1.150; P=0.346
Latencia 1ª M (s)	21.5±7.5	12.5±2.8	20.5±8.8	46.9±20.7	F(3,28)=1.557; P=0.222
Latencia 1ª I (s)	21.5±5.4	27.9±11.9	44.9±26.4	56.2±17.0	F(3,28)=0.835; P=0.486
# M 1ª serie	8.9±2.2	14.9±5.0	14.1±4.1	12.4±3.6	F(3,28)=0.473; P=0.703
# I 1ª serie	9.6±2.7	7.9±0.6	8.5±1.8	8.3±4.4	F(3,28)=0.085; P=0.968
Latencia 1ª E (s)	319.9±90.2	531.9±144.1	704.4±261.7	725.1±249.0	F(3,28)=0.888; P=0.460
PEL ₁	283.2±23.1	120.9±216.1	251.5±53.5	60.4±290.4	F(3,24)=1.820; P=0.170
IR ₁	51.2±4.6	41.4±5.3	43.2±5.7	33.8±8.9	F(3,27)=0.788; P=0.511

M=Monta; I= Intromisión; E=Eyacuación; PEL=Intervalo post eyaculatorio; # =número; IR= Relación de intromisión = [# intromisiones / (# intromisiones + # montas)]*100

Tabla Supl.4: Efectos de la naloxona y el tramadol en el comportamiento sexual de ratas macho de la cepa Wistar. N=8 animals por grupo.

Dosis de fármaco, mg/kg	0 mg/kg (salina + salina)	20 mg/kg Naloxona + salina	20 mg/kg Naloxona + 50mg/kg Tramadol	ANOVA significancia
	A	B	C	
Parámetros medidos	Mean± SEM	Mean± SEM	Mean± SEM	
# E	2.6±0.3	0.6±0.3*	0.4±0.2*	F(2,21)=26.545; P <0.001
Latencia 1ª M (s)	8.4±5.0	114.3±60.7	743.5±310.1*	F(2,21)=4.744; P=0.020
Latencia 1ª I (s)	11.5±2.2	249.6±146.3	1213.8±295.8* ; (bc)	F(2,21)=11.167; P<0.001
# M 1ª serie	11.9±4.4	29.3±9.6	4.5±1.7	F(2,21)=4.208; P=0.029

# I 1ª serie	5.6±1.0	5.8±1.2	2.9±1.6 (bc)	F(2,21)=1.618; P=0.222
Latencia 1ª E (s)	288.0±62.4	1262.5±228.2*	1522.6±171.8*	F(2,21)=14.869; P<0.001
PEL ₁	318.5±18.1	1099.8±264.9*	1456.1±225.2*	F(2,21)=8.379; P=0.002
IR ₁	41.1±7.3	19.2±4.1	26.5±11.3	F(2,18)=2.798; P=0.092

M=Monta; I= Intromisión; E=Eyaculación; PEL=Intervalo post eyaculatorio; # =número; IR= Relación de intromisión = [# intromisiones / (# intromisiones + # montas)]*100

* = Significativamente diferente de 0 mg/kg (p <0.05).

(bc) = significativamente diferente (p <0.05) entre 20 mg/kg naloxona + solución salina (B) y 20 mg/kg naloxona + 50 mg/kg Tramadol (C).

Tabla Supl. 5: Efectos de WAY100,635 (antagonista del receptor 5-HT_{1A}) y tramadol sobre el comportamiento sexual de ratas macho de la cepa Wistar. N=8/grupo.

Dosis de fármaco, mg/kg	0 mg/kg (salina + salina) A	1 mg/kg WAY100635 + Salina B	1 mg/kg WAY100,635+ 25mg/kg Tramadol C	ANOVA significancia
Parámetros medidos	Media±SEM	Media±SEM	Media±SEM	
# E	3.1±0.4	2.4±0.3	0.3 ±0.2* (bc)	F(2,21)=22.582; P<0.001
Latencia 1ª M (s)	14.9±7.0	18.0±11.5	895.9 ±303.5* (bc)	F(2,17)=9.967; P=0.001
Latencia 1ª I (s)	50.9±26.0	68.7±42.1	926.7 ±328.7* (bc)	F(2,17)=8.020; P=0.004
# M 1ª serie	11.6±2.4	12.6±4.6	10.0±5.8	F(2,17)=0.085; P=0.919
# I 1ª serie	6.1±0.8	5.6±0.7	3.2±1.5	F(2,17)=2.323; P=0.128
Latencia 1ª E (s)	407.9±110.2	356.7±104.8	1482.0±201.3* (bc)	F(2,17)=19.774; P<0.001
PEL ₁	305.5±20.5	291.3±17.0	1558.2 ±241.8* (bc)	F(2,17)=31.761; P<0.001
IR ₁	37.0±5.2	40.8±7.8	31.4±10.5 (n=4)	F(2,15)=0.338; P=0.719

M=Monta; I= Intromisión; E=Eyaculación; PEL=Intervalo post eyaculatorio; # =número; IR= Relación de intromisión = [# intromisiones / (# intromisiones + # montas)]*100

* = Significativamente diferente de 0 mg/kg (p <0.05).

(bc) = significativamente diferente (p <0.05) entre 1 mg/kg WAY100635 + solución salina (B) y 1 mg/kg WAY100635 + 25mg/kg Tramadol (C).

Tabla Supl. 6: Efectos de Tramadol sobre el comportamiento sexual de ratas macho de la cepa Wistar. N=8/grupo.

Dosis de fármaco, mg/kg	0 mg/kg (salina)	12.5mg/kg Tramadol	25.0 mg/kg Tramadol	ANOVA significancia
Parámetros medidos	Media±SEM	Media±SEM	Media±SEM	
# E	2.8±0.5	2.3±0.5	1.5±0.5	F(2,21)=1.797; P=0.190

<i>Latencia 1ª M</i> (s)	4.7±1.5	12.2±3.5	344.0±197.7	F(2,21)=2.880P=0.078
<i>Latencia 1ª I</i> (s)	29.8±12.2	50.8±16.8	348.6±211.2	F(2,21)=2.110; P=0.145
<i># M 1ª serie</i>	23.0±6.8	20.9±7.8	17.4±5.8	F(2,21)0.171; P=0.844
<i># I 1ª serie</i>	7.5±1.0	7.0±1.5	5.6±1.6	F(2,21)=0.492; P=0.618
<i>Latencia 1ª E</i> (s)	566.7±200.2	673.1±215.4	1062.9±252.2	F(2,21)=1.364; P=0.277
<i>PEL₁</i>	473.0±189.9	508.4±185.5	1081.0±272.1	F(2,21)=2.418; P=0.113
<i>IR₁</i>	29.8±5.1	33.7±5.3	25.8±4.9	F(2,21)=0.569; P=0.575

M=Monta; I= Intromisión; E=Eyacuación; PEL=Intervalo post eyaculatorio; # =número; IR= Relación de intromisión = [# intromisiones / (# intromisiones + # montas)]*.

Tabla Supl. 7: Efectos de WAY100635 (antagonista del receptor 5HT_{1A}) y paroxetina en el comportamiento sexual de ratas macho de la cepa Wistar. N=8/grupo.

Dosis de fármaco, mg/kg IP	0 mg/kg (salina +salina) A	0.1 mg/kg WAY100635 + salina B	0.3 mg/kg WAY100635 + salina C	Salina + 10mg/kg paroxetina D	0.1 mg/kg WAY100635 + 10mg/kg paroxetina E	0.3 mg/kg WAY100635 + 10mg/kg paroxetina F	ANOVA significancia
Parámetros medidos	Media± SEM	Media± SEM	Media± SEM	Media± SEM	Media± SEM	Media± SEM	
# E	2.4±0.2	1.5±0.5	2.5±0.3	1.5±0.4	0.0±0.0*; b;d	0.0±0.0*;c;d	F(5,42)=13.619; P<0.001
Latencia 1ª M (s)	19.3±11.1	88.9±74.3	8.1±2.2	54.4±33.8	923.9±286.1*; b;d	1527.2±222.7* c;d	F(5,42)=17.810; P<0.001
Latencia 1ª I (s)	25.5±14.4	350.0±213.8	21.0±10.1	451.2±221.3	1415.2±190.3*;b;d	1800.0±0.0*;c;d	F(5,42)=25.780; P<0.001
# M 1ª serie	15.6±3.9	19.1±7.3	12.4±2.0	13.8±3.6	6.6±2.8	1.1±1.0	F(5,42)=2.696; P=0.034
# I 1ª serie	10.5±4.7	4.3±0.8	10.0±2.2	4.8±2.1	0.8±0.3	0.0±0.0* ;	F(5,42)=5.700; P=0.007
Latencia 1ª E (s)	352.9±57.6	1008.3±241.6	501.9±127.4	986.3±44.7	1800.0±0.0*;b;d	1800.0±0.0*;c;d	F(5,42)=16.639; P<0.001
PEL ₁	344.3±16.2	693.3±242.9	347.7±20.7	895.9±265.3	1800.0±0.0*;b;d	1800.0±0.0*;c;d	F(5,42)=20.648; P<0.001
CE ₁	40.0±6.8	35.5±11.1	44.6±4.9	31.0±6.3	n=4; 15.7±6.1	n=0	F(5,42)=1.462; P=0.238

M=Monta; I= Intromisión; E=Eyacuación; PEL=Intervalo post eyaculatorio; # =número; IR= Relación de intromisión = [# intromisiones / (# intromisiones + # montas)]*100

* = Significativamente diferente de 0 mg/kg (p <0.05).

b = significativamente diferente (p <0.05) de 0.1 mg/kg WAY100635 + solución salina (B); c = significativamente diferente (p <0.05) de 0.3 mg/kg WAY100635 + solución salina (C); d = significativamente diferente (p <0.05) de solución salina + 10 mg/kg de paroxetina (D)

Capítulo 5

Efectos inhibitorios del tramadol sobre el comportamiento sexual: estudios farmacológicos en ratas noqueadas del transportador de serotonina

Esquivel-Franco, D.C^{1,2,3}, Olivier, B.^{1,4,5}, Waldinger, M.D.⁶, Gutiérrez-Ospina, G.^{3,7}, Olivier, J.D.A.^{1*}

¹Neurobiology, Groningen Institute for Evolutionary Life Sciences (GELIFES), University of Groningen, Groningen, the Netherlands.

²Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.

³Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB). Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.

⁴Department of Psychopharmacology, Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences, Science Faculty, Utrecht University, Utrecht, the Netherlands.

⁵Department of Psychiatry, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA.

⁶Department of Pharmacology & Physiology, College of Medicine, Drexel University, Philadelphia, PA, USA.

⁷Coordinación de Psicobiología y Neurociencias, Facultad de Psicología, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.

Frontiers in Pharmacology

Resumen:

El tramadol es una intervención farmacológica eficaz en la eyaculación precoz humana. Para investigar si la acción inhibitoria del tramadol es causada principalmente por sus efectos como inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina (ISRS), evaluamos los efectos dosis-respuesta del tramadol sobre el comportamiento sexual en animales wildtype ($SERT^{+/+}$) y noqueadas al transportador de serotonina, heterocigoto ($SERT^{+/-}$) y homocigoto ($SERT^{-/-}$). Para investigar si otros mecanismos contribuyen a los efectos inhibitorios, WAY100,635, un antagonista del receptor 5-HT_{1A} y naloxona, un antagonista del receptor opioide μ , se evaluaron en el comportamiento sexual junto con tramadol. El tramadol disminuye la actividad sexual de forma dependiente de la dosis en todos los genotipos. En todos los estudios, las ratas $SERT^{+/-}$ no respondieron de manera diferente a las ratas $SERT^{+/+}$. WAY100,635 no afectó la actividad sexual en $SERT^{+/+}$, pero redujo la actividad sexual dependiente de la dosis en ratas $SERT^{-/-}$. WAY100,635 (0.3 mg/kg) combinado con tramadol (20 mg/kg) redujo significativamente la actividad sexual en $SERT^{+/+}$ e incluso de forma más potente en ratas $SERT^{-/-}$. La naloxona no afectó el comportamiento sexual de manera consistente en las ratas $SERT^{+/+}$, mientras que en las ratas $SERT^{-/-}$ todas las dosis redujeron ligeramente la frecuencia de la eyaculación. La combinación de naloxona (20 mg/kg) y tramadol (20 mg/kg) disminuyó las frecuencias de eyaculación en ambos genotipos. Curiosamente, la combinación de tramadol (20 mg/kg), WAY100,635 (0.3 mg/kg) y naloxona (20 mg/kg) condujo a la eliminación completa de toda actividad sexual en ratas $SERT^{+/+}$ y $SERT^{-/-}$. Estos hallazgos sugieren que los efectos inhibitorios del tramadol sobre el comportamiento sexual masculino en ratas $SERT^{+/+}$ se deben principalmente, si no exclusivamente, a la inhibición del transportador de serotonina, con un papel importante para los receptores 5-HT_{1A}, aunque influyen otros sistemas (por ejemplo, noradrenérgicos), que no pueden ser excluidos. A medida que los ISRS ejercen su inhibición sexual después de la administración crónica, el tramadol puede ser terapéuticamente atractivo como terapia "a demanda" para la eyaculación precoz.

Palabras clave: ISRS, comportamiento sexual, tramadol, rata, receptor 5-HT_{1A}, receptor opioide μ , transportador de serotonina.

1. Introducción

Tramadol es un analgésico de uso mundial que produce anti nocicepción por activación de receptores opioides μ (Hennies, Friderichs, & Schneider, 1988). La investigación reciente ha demostrado que el tramadol es eficaz en el tratamiento de la eyaculación precoz (EP) en humanos (Bar-Or et al., 2012; Eassa & El-Shazly, 2013; Yang et al., 2013). El tramadol es una mezcla racémica de dos enantiómeros (Frink et al., 1996). El primer enantiómero ((+) - tramadol) y su metabolito ((+) - M₁) son agonistas selectivos del receptor opioide μ y también tienen efectos inhibidores de la recaptación serotoninérgica (ISRS); el segundo enantiómero ((-) - tramadol) y el metabolito (-) - M₁ producen inhibición de la recaptación de noradrenalina (Matthiesen et al., 1998). Debido a sus propiedades SSRI, el tramadol tiene efectos similares a los antidepresivos (Rojas-Corrales et al., 2002; Rojas-Corrales, Gibert-Rahola, et al., 1998). Los ISRS se usan principalmente como antidepresivos debido a la inhibición del transportador de serotonina (SERT), lo que lleva a un mayor nivel de 5-HT en la hendidura sináptica. Sin embargo, el tratamiento con ISRS se ha asociado con la aparición de algunos efectos secundarios graves, como una disminución en la capacidad de eyacular o ausencia de orgasmo (Balon, 2006); lo que resulta en un impacto significativo en la calidad de vida de un individuo que en la mayoría de los casos conduce al incumplimiento del tratamiento (Higgins et al., 2010).

Anteriormente, demostramos (Olivier et al., 2017) que el tramadol inhibe el comportamiento sexual en ratas macho y postulamos que esto se debe principalmente a sus propiedades SSRI, aunque la actividad agonista del receptor opioide μ de tramadol podría contribuir de manera menor a la inhibición del comportamiento sexual. La activación serotoninérgica de la actividad sexual en ratas macho se basa principalmente en la activación de los receptores 5-HT_{1A} en función de los efectos pro sexuales observados después de los agonistas del receptor 5-HT_{1A} (Snoeren et al., 2014). La

administración conjunta aguda de un antagonista del receptor 5-HT_{1A} y el ISRS inhibe el comportamiento sexual de la rata macho, lo que indica que los posibles efectos secundarios sexuales del tratamiento crónico con ISRS dependen del grado de modulación del receptor 5-HT_{1A} (de Jong et al., 2005). En el presente trabajo evaluamos más a fondo el papel de la actividad del receptor 5-HT_{1A} y la actividad agonista del receptor opioide μ en la inhibición del comportamiento sexual del tramadol. Con este fin, utilizamos ratas noqueadas al transportador de serotonina (SERT) porque crean la posibilidad de estudiar la influencia del tramadol en el sistema opioide μ (y posiblemente otros sistemas) sin la influencia concomitante del bloqueo del SERT en el comportamiento sexual masculino. Aunque se ha reportado que los receptores 5-HT_{1A} se ven sensibilizados en ratas noqueadas homocigóticas a SERT (SERT^{-/-}; Chan et al., 2011; Berend Olivier et al., 2011) prácticamente no se conoce nada sobre los cambios en otros sistemas, incluido el sistema opioide. En los estudios actuales, basados en nuestro trabajo previo (Olivier et al., 2017), primero exploramos varias dosis de tramadol (5, 10, 20, 40 y 50 mg/kg IP) sobre el comportamiento sexual de animales tipo salvaje (SERT^{+/+}), ratas macho heterocigotas (SERT^{+/-}) o SERT^{-/-}, seleccionadas y entrenadas para la actividad sexual promedio (2-3 eyaculaciones por prueba de 30 minutos después de un período de entrenamiento de 6 semanas). Debido a que sabíamos por estudios previos (Olivier et al., 2017) que una dosis más alta de tramadol (40 mg/kg) en ratas de tipo salvaje solo podía verse marginalmente influenciada por la naloxona, combinamos una dosis ligeramente inhibitoria de tramadol (20 mg/kg) en los tres genotipos con naloxona, un antagonista del receptor de opiáceos μ . En otro conjunto de estudios, combinamos tramadol (20 mg/kg) con una dosis seleccionada de comportamiento sexual inactivo del antagonista del receptor 5-HT_{1A} WAY100,635 (0.3 mg/kg). Este experimento fue sustentado por nuestro hallazgo anterior, con la idea de que la combinación de dosis sexualmente inactivas de un antagonista del receptor 5-HT_{1A} con una dosis sexualmente

inactiva de un ISRS después de la administración aguda inhibe fuertemente el comportamiento sexual (de Jong et al., 2005). Finalmente, WAY100,635 (0.3 mg/kg) y naloxona (20 mg/kg) se combinaron con tramadol (20 mg/kg) para desentrañar los posibles efectos moduladores y aclarar posibles interacciones.

2. Materiales y métodos

2.1 Animales

Las ratas de la cepa Wistar se criaron en nuestras instalaciones para animales (Universidad de Groningen, GELIFES) utilizando machos y hembras SERT^{+/-}, lo que resultó en ratas macho y hembra SERT^{+/+}, SERT^{+/-} y SERT^{-/-}. Se usaron ratas macho SERT^{+/+}, SERT^{+/-} y SERT^{-/-} de al menos 12 semanas de edad para experimentos de comportamiento sexual. Se utilizaron las hembras SERT^{+/+} y SERT^{+/-} como hembras de estímulo sexual. Las ratas se alojaron en condiciones de luz-obscuridad invertida (luz 12 h: oscuridad 12 h, luces apagadas de 9:00 a.m. a 9 p.m.). Los animales fueron alojados socialmente (2-5 por jaula, máximo 4 para machos). Se proporcionaron bloques de madera y material de anidación para el enriquecimiento de la jaula. Las ratas tenían acceso *ad libitum* a comida y agua. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las pautas gubernamentales para el cuidado y uso de animales de laboratorio (Centrale Commissie Dierproeven). Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar la cantidad de animales y el posible sufrimiento.

2.2 Ratas hembras

Las hembras tenían ligadura doble de trompas para evitar gestaciones. Para realizar la cirugía, las hembras fueron anestesiadas (isoflurano) y recibieron analgésicos (fynadina, 0.1 mg/100 g) antes de la cirugía, y a las 24 y 48 horas después de la cirugía. Las hembras tenían al menos 12 semanas

de edad cuando se realizó la cirugía, y se administraron dos semanas de recuperación antes de que se les indujera receptividad sexual con estradiol (50 µg en 0.1 ml de aceite, SC, 36-48 horas antes de la prueba) para el entrenamiento de comportamiento sexual (pruebas y experimentos). Las hembras se usaron una vez cada dos semanas y no más de 2 veces por día experimental.

2.3 Tratamiento farmacológico y experimentos conductuales

Se planificó un diseño aleatorio cruzado para evitar que los animales recibieran las mismas dosis de fármaco o vehículo durante todos los experimentos, que se realizaron durante un par de meses. Como se describió anteriormente en Olivier et al. (2017), cuando se realizaron pruebas farmacológicas, a las ratas macho se les dio un tiempo de habituación de 30 minutos en las cámaras de prueba justo después de la administración del medicamento mediante inyección IP, antes de que se introdujera la rata hembra. Se administraron inyecciones múltiples consecutivas a 10 minutos de intervalo. Todo el comportamiento durante la prueba de 30 minutos se grabó en video después de la introducción de la hembra y también se evaluó en vivo y se registraron los siguientes parámetros de la primera serie de eyaculación (Chan et al., 2011): número de eyaculaciones (E), número de montas (M), número de intromisiones (I), latencia (s) a la primera monta (LM), latencia (s) a la primera intromisión (LI) y latencia (s) a la primera eyaculación (LE). Después de la eyaculación, se calculó el intervalo post eyaculatorio (PEI, por sus siglas en inglés), utilizando el tiempo desde la primera eyaculación y el tiempo de la primera monta / intromisión (lo que ocurrió primero) de la segunda serie eyaculatoria. La relación de intromisión (IR, por sus siglas en inglés) se calculó como: $IR = (\# I / (\# I + \# M)) * 100\%$. EL se calculó utilizando el tiempo de la primera serie de eyaculación menos la latencia de intromisión de la primera serie de eyaculación. Los porcentajes de animales que realizan conducta sexual durante el período experimental se pueden encontrar en la figura complementaria 2.

Debido a que es importante tener una farmacodinámica y una cinética comparables en los estudios farmacológicos, se ha elegido una prueba de duración fija; 30 minutos (1800 segundos). Los parámetros de solo la primera serie de eyaculación, que incluye el primer intervalo post eyaculatorio, se usaron para ejecutar el análisis estadístico. La razón detrás de esto es que algunos tratamientos pueden disminuir el comportamiento sexual e incluso inhibirlo completamente (por ejemplo, cero eyaculaciones) y algunos animales no pueden usarse para realizar estadísticas. Para esos casos, utilizamos valores artificiales de 1800 segundos (es decir, la duración máxima de la prueba) para las latencia de eyaculación, monta e intromisión, aunque esto es sin duda un tema de discusión como hemos mencionado antes (Chan et al., 2011; Olivier et al., 2017). En los casos en que los fármacos inhibieron el comportamiento eyaculatorio, pocos animales eyacularon una segunda vez o no fue posible realizar análisis estadísticos de la segunda serie eyaculatoria. Si un fármaco bloqueó la eyaculación y el rendimiento sexual, los valores de datos atribuidos a EL, ML, IL fueron 1800 segundos y los valores de frecuencia (MF, IF) para todos los animales con fines estadísticos. Todas las tablas y figuras muestran los resultados de la primera serie de eyaculación.

2.4 Fármacos

El clorhidrato de tramadol (Farmacia, UMCG Groningen, Países Bajos, con una vida media de 6 horas) se preparó a partir de tabletas (100mg) obtenidas de una farmacia local, molidas y suspendidas en NaCl al 0.9% (solución salina). El clorhidrato de naloxona (Abcam; Cambridge, Reino Unido, vida media de 90 minutos)) y el maleato WAY100,635 (Tocris Bioscience; Bristol, Reino Unido, vida media de 2-4 horas)) se disolvieron en solución salina y cada solución se preparó recientemente en cada día de prueba. Todos los fármacos se administraron mediante inyección intraperitoneal (IP).

2.5 Entrenamiento

Después de las pruebas de entrenamiento de 6 semanas (30 min/prueba), las ratas macho fueron consideradas sexualmente entrenadas y clasificadas según las frecuencias de eyaculación por prueba en grupos: promedio (2-3 eyaculaciones/prueba), rápido (> 3 eyaculaciones/prueba) y lento (0-1 eyaculaciones/prueba); (Chan et al., 2008; B Olivier et al., 2006; Pattij et al., 2005). En consecuencia, noventa y cinco machos fueron entrenados sexualmente, de los cuales se seleccionaron y utilizaron un total de 36 ratas machos con un número promedio de eyaculaciones durante todos los experimentos, que duraron 25 semanas. En todos los experimentos individuales se usaron 12 ratas por genotipo ($SERT^{+/+}$ (N=32), $SERT^{+/-}$ (N=32) y $SERT^{-/-}$ (N=31)) y los animales se usaron solo una vez por semana para garantizar suficiente tiempo de lavado de los fármacos. Las ratas tuvieron un período de habituación de 10 minutos en la caja de prueba justo antes de la sesión de entrenamiento. Al final del período de habituación, se introdujo una hembra receptiva en la caja y se evaluó el comportamiento sexual durante 30 minutos. Las hembras que no eran receptivas fueron cambiadas por una hembra diferente que mostró receptividad. El entrenamiento y las pruebas se realizaron en cajas de prueba rectangulares de madera (57 cm x 82 cm x 39 cm; pared de vidrio) llenas de material de cama regular. Para estimular el comportamiento sexual, no se cambió el material de cama durante el entrenamiento y las pruebas para preservar las feromonas de las rondas anteriores y crear un ambiente sexual más competitivo. Los parámetros sexuales evaluados fueron: número total de eyaculaciones de todas las pruebas; el número total de montas e intromisiones por serie eyaculatoria y sus respectivas latencias se evaluaron durante las semanas 2, 3 y 6. Solo los machos que mostraron niveles de eyaculación estables (2-3 eyaculaciones en las últimas pruebas de entrenamiento) se utilizaron para los experimentos farmacológicos (N=12 por genotipo, 36 en total). Aunque las ratas macho $SERT^{-/-}$ generalmente muestran un nivel de comportamiento sexual más

bajo que las ratas SERT^{+/+} (Chan et al., 2011; Berend Olivier et al., 2011) seleccionamos los animales SERT^{-/-} de mayor rendimiento, determinados por el número de eyaculaciones/pruebas, para estos experimentos para evitar diferencias de línea base que pueden complicar los estudios farmacológicos. Todas las sesiones de entrenamiento y experimentos se realizaron en condiciones de luz roja entre las 10:00 a.m. y las 17:00 p.m.

2.6 Experimentos farmacológicos

Diseño experimental: Seleccionamos 36 ratas macho de un grupo de 95 machos que fueron entrenados semanalmente durante 6 semanas en su comportamiento sexual basal. Estas 36 ratas (12 de cada genotipo) no diferían en su nivel de rendimiento sexual. Se realizaron cuatro experimentos en estas 36 ratas, realizando una prueba por semana en cada rata. Las dosis de fármacos y vehículos probados se distribuyeron a través de un diseño cruzado. Entre los experimentos, se proporcionó al menos una semana de descanso (sin prueba).

Experimento uno: respuesta a la dosis de tramadol. Se seleccionaron 36 ratas macho eyaculadoras promedio (N=12 por genotipo). Los tres grupos siguieron un diseño cruzado y recibieron vehículo (solución salina), 5, 10, 20, 40 y 50 mg/kg de tramadol, IP (clorhidrato de tramadol). Debido a que físicamente no era posible evaluar 36 animales en un día de prueba, realizamos dos pruebas por semana en días consecutivos (siempre los mismos dos días) durante seis semanas y aleatorizamos animales y el tratamiento durante estos dos días y durante las seis semanas.

Experimento dos: WAY100,635 dosis respuesta. Se utilizaron los mismos 36 animales en un diseño cruzado para recibir vehículo (solución salina), 0.1, 0.3 y 1 mg/kg WAY100,635, IP. Las pruebas se realizaron durante cuatro semanas y dos días consecutivos por semana.

Experimento tres: respuesta a la dosis de naloxona. Se utilizaron los mismos 36 animales en un vehículo de diseño cruzado (solución salina), 5, 10 y 20 mg/kg de naloxona, IP. Las pruebas se realizaron durante cuatro semanas y dos días consecutivos por semana.

Experimento cuatro: Tramadol + WAY100,635 + Naloxona. Las 36 ratas fueron tratadas usando un diseño cruzado con vehículo + vehículo, vehículo + tramadol (20 mg/kg), tramadol (20 mg/kg) + WAY100,635 (0.3 mg/kg;), tramadol (20 mg/kg) + naloxona (20 mg/kg) o tramadol (20 mg/kg) + WAY100,635 (0.3 mg/kg) + naloxona (20 mg/kg) usando dosis IP. Este experimento se realizó durante seis semanas y dos días consecutivos por semana.

2.7 Análisis estadísticos

Para el tramadol, los datos de los experimentos de respuesta a la dosis de WAY100,635 y naloxona se distribuyeron normalmente y fueron analizados con pruebas paramétricas, realizando ANOVA de una vía con medidas repetidas y prueba *post hoc* de Bonferroni (dentro del grupo) y ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* Dunn (entre grupos) para analizar estos datos. Para el último experimento (Tramadol + WAY100635 + Naloxona) los datos no se distribuyeron normalmente y se realizaron estadísticas no paramétricas; prueba de medidas repetidas de Friedman con una prueba *post hoc* de suma de rango (Tukey-HSD) y un ANOVA bidireccional de Friedman con comparaciones múltiples. Todos los datos se analizaron con el software GraphPad Prism 6.0 (Graph Pad Software Inc., La Jolla, EE. UU.). El nivel de significancia se estableció en $p < 0.05$. Los datos paramétricos se expresan como media \pm SEM y los datos no paramétricos se expresan como mediana y rango Inter cuartil (IQR).

3. Resultados

3.1 Estabilidad sexual

El rendimiento sexual de los animales durante la duración del estudio se estabilizó durante todo el período de la sesión de entrenamiento. De las 95 ratas macho entrenadas sexualmente, solo 36 animales que mostraron rendimiento sexual y eyaculaciones fueron seleccionados para realizar los estudios farmacológicos (SERT^{+/+} y SERT^{+/-}: 2-3 eyaculaciones; SERT^{-/-} 1-2 eyaculaciones). Durante este período, se registró el número de eyaculaciones y los animales mostraron un comportamiento eyaculatorio estable (figura 1). Las frecuencias de eyaculación de los animales SERT^{+/-} no fueron significativamente diferentes de las ratas SERT^{+/+}; Las ratas SERT^{-/-} no difirieron significativamente en las frecuencias de eyaculación en comparación con las ratas de tipo salvaje durante toda la duración de los experimentos. Debido a que los animales SERT^{+/-} no mostraron diferencias significativas con respecto a las ratas SERT^{+/+} en ningún momento en ningún experimento farmacológico, no se utilizaron todos los resultados de los animales SERT^{+/-}, pero todos los datos se pueden encontrar en las figuras y tablas suplementarias.

Debido a que probamos los animales experimentales durante un período de tiempo extenso (más de medio año), podría existir un riesgo de cambios en el nivel de rendimiento sexual con el tiempo. Además, los animales recibieron secuencialmente un número considerable y dosis de diferentes fármacos. Aunque después de cada administración farmacológica se dejó pasar un periodo de por lo menos una semana (washout) para eliminar cualquier rastro de fármacos, ya que siempre existe la posibilidad de que se produzcan efectos de "arrastre". Este es un efecto que "se transfiere" de una condición experimental a otra, ya que siempre que los sujetos se desempeñen en más de una condición (como lo hacen en diseños cruzados) existe la posibilidad de efectos de arrastre. No encontramos evidencia de cambios en el nivel basal de comportamiento sexual a lo largo del tiempo,

ni de ningún efecto de "arrastre" con los fármacos utilizados. La figura 1 ilustra que los valores del "vehículo" (placebo; por ejemplo, de la frecuencia de la eyaculación) de los tres grupos de genotipos son muy constantes a lo largo del tiempo (al menos por 26 semanas; tabla supl. 1). Estos hallazgos están en línea con nuestros experimentos anteriores y lo reportado en la literatura usando tramadol (Olivier et al., 2017;Olivier et al., 2017b).

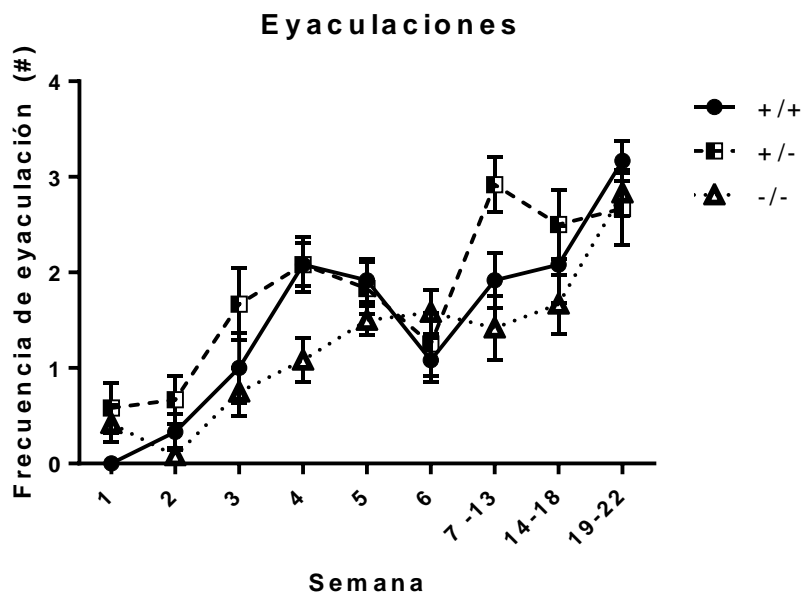
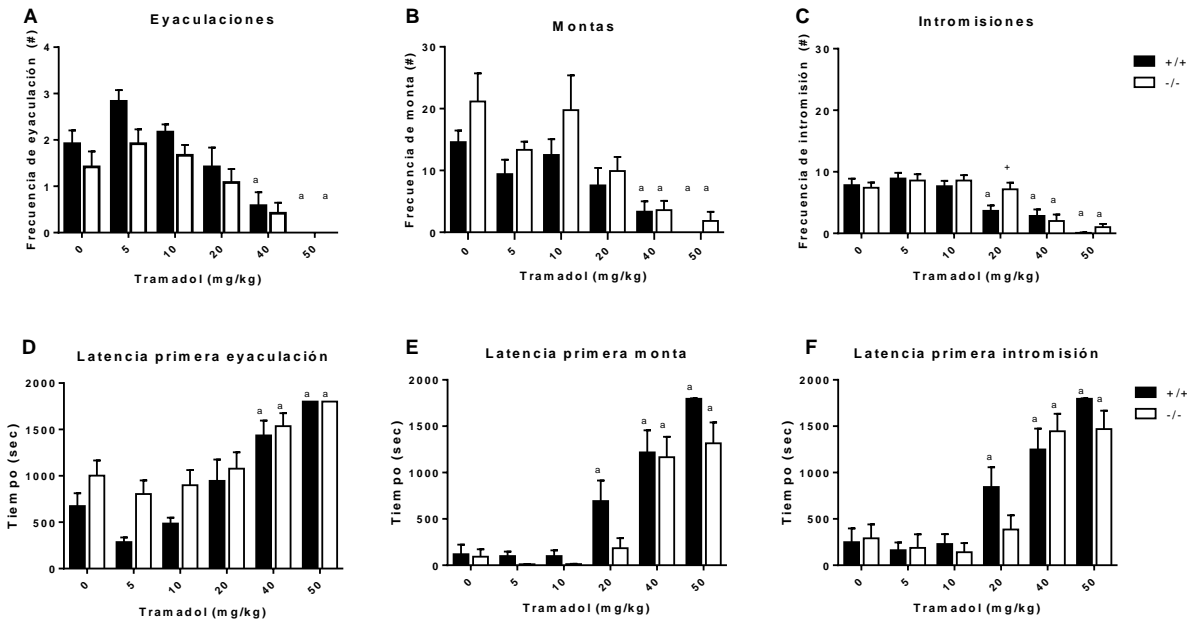


Figura 1. Distribución de frecuencias de eyaculación de ratas macho Wistar que fueron entrenadas sexualmente durante 6 semanas (total n=95; SERT^{+/+} n=32, SERT^{+/-} n=32 y SERT^{-/-} n=31) y analizadas farmacológicamente a partir de semana 7 a 25. Total n=36; SERT^{+/+} n=12, SERT^{+/-} n=12 y SERT^{-/-} n=12.

3.2 Respuesta a la dosis de tramadol

En el experimento de dosis-respuesta (Experimento. 1; figura. 2; Tablas Supl. 3 y 4) las dosis más bajas de tramadol (5 y 10 mg/kg) no tuvieron efectos significativos sobre el comportamiento sexual; las dosis intermedias y altas (20, 40 y 50 mg/kg) indujeron efectos significativos sobre los parámetros del comportamiento sexual (figura 2) en animales SERT^{+/+}, mientras que solo las dosis

de 40 y 50 mg/kg indujeron efectos significativos en ratas macho $SERT^{-/-}$. Con estas dosis altas, los números de E, M y I disminuyeron significativamente y las latencias de E, M y I aumentaron



significativamente en comparación con el grupo placebo (solución salina). La dosis de 50 mg/kg provocó una reducción dramática de la actividad sexual en los animales $SERT^{+/+}$ y $SERT^{-/-}$. La dosis de 20 mg/kg aumentó significativamente las latencias de monta e intromisión y disminuyó significativamente la frecuencia de intromisión en animales $SERT^{+/+}$, y el número de intromisiones fue significativamente diferente entre los genotipos.

Figura 2. Comportamiento sexual de ratas macho (N = 12/grupo) tratadas con 0, 10, 20, 40 o 50 mg/kg de tramadol. Los datos se representan como la media \pm SEM. Se proporciona el número y la latencia de las eyaculaciones por 30 min (A, D), el número y la latencia de las montas (B, E), el número y la latencia de las intromisiones (C, F) de la primera serie de eyaculación. Los análisis estadísticos detallados (ANOVA de medidas repetidas) se muestran en las Tablas Supl. 1 y 2. a: diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación con el grupo de solución salina. +: diferencia significativa ($p < 0.05$) entre $SERT^{+/+}$ y $SERT^{-/-}$.

3.3 Respuesta a la dosis de WAY100,635

Las dosis de WAY100,635 (0.1, 0.3 y 1 mg/kg) no tuvieron efectos significativos sobre los parámetros sexuales en animales $SERT^{+/+}$; sin embargo, en las ratas $SERT^{-/-}$ todas las dosis

redujeron significativamente la frecuencia de eyaculación y aumentaron la latencia de eyaculación (figura 3; Tablas Supl. 5 y 6) en comparación con la solución salina. El número de montas (a 1 mg/kg) e intromisiones (a 0.3 y 1 mg/kg), y la relación de intromisión (a 0.1, 0.3 y 1 mg/kg) disminuyeron significativamente, mientras que las latencias de monta e intromisión (a 0.3 y 1 mg/kg) aumentaron significativamente en las ratas $SERT^{-/-}$ en comparación con las ratas $SERT^{+/+}$.

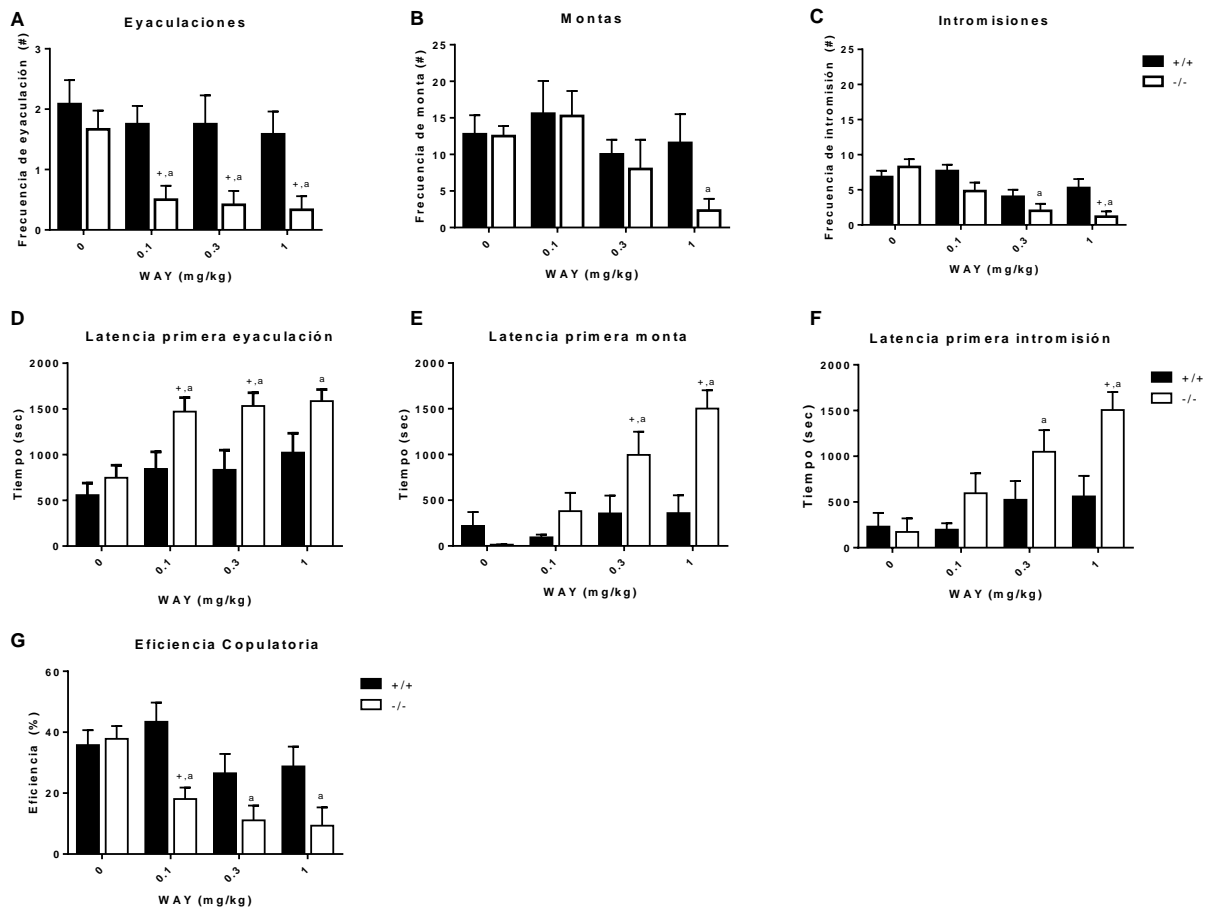


Figura 3. Comportamiento sexual de ratas macho (N = 12/grupo) tratadas con solución salina, WAY100,635 0.01 mg/kg, WAY100,635 0.03 mg/kg o WAY100,635 3 mg/kg. Los datos se representan como media \pm SEM. El número y la latencia de las eyaculaciones por 30 min (A, D), el número y la latencia de las montas (B, E), el número y la latencia de las intromisiones (D, F) y la eficiencia copulatoria (G). Los análisis estadísticos detallados (ANOVA de medidas repetidas) se muestran en las Tablas Supl.3 y 4. a: diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación con el grupo de solución salina. +: diferencia significativa ($p < 0.05$) entre $SERT^{+/+}$ y $SERT^{-/-}$.

3.4 Respuesta a la dosis de naloxona

La naloxona tuvo efectos muy limitados en los animales SERT^{+/+}; solo la dosis de 5 mg/kg disminuyó la frecuencia de eyaculación (figura 4; Tablas Supl.7 y 8), pero no en ratas SERT^{+/-}. La naloxona (5, 10 y 20 mg/kg) tuvo efectos significativos en la frecuencia de eyaculación de las ratas SERT^{-/-}, disminuyendo ligeramente (pero no de forma dependiente de la dosis) el número de eyaculaciones. El resto de los parámetros (frecuencias y latencias M e I) no se vieron significativamente afectados en animales SERT^{+/+} o SERT^{-/-}. La eficiencia para eyacular (IR) aumentó después de la administración de 10 y 20 mg/kg de naloxona en animales SERT^{+/+}.

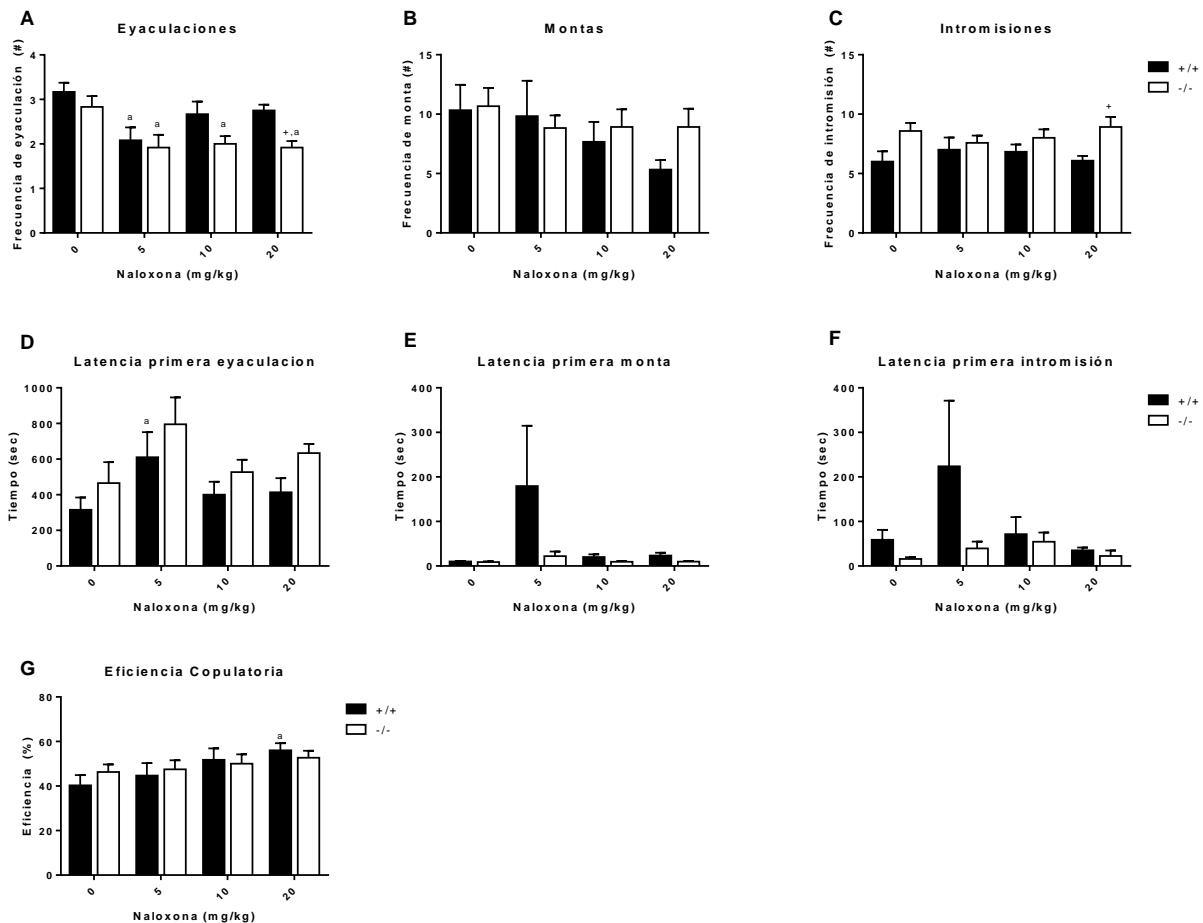


Figura 4. Comportamiento sexual de ratas macho (N = 12/grupo) tratadas con solución salina, naloxona 5 10 mg/kg ó 20 mg/kg. Los datos se expresan como la media ± SEM. El número y la latencia de las eyaculaciones por 30 min (A,

D), el número y la latencia de las montas (B, E), el número y la latencia de las intromisiones (C, F) y la eficiencia copulatoria (G). Los análisis estadísticos detallados (ANOVA de medidas repetidas) se muestran en las tablas supl. 5 y 6. a: diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación con el grupo de solución salina. +: diferencia significativa ($p < 0.05$) entre SERT^{+/+} y SERT^{-/-}.

3.5 Interacciones de WAY100,635, naloxona y tramadol

Tramadol (20 mg/kg) no indujo diferencias significativas en comparación con placebo (S + S) en animales SERT^{+/+} o SERT^{-/-} (figura 6; tablas supl. 9 y 10). La combinación de tramadol (20 mg/kg) con 0.3 mg/kg de WAY100,635 en comparación con el vehículo (S + S), indujo disminuciones significativas en E y M, y un aumento en LM en ratas SERT^{+/+}, mientras que en SERT^{-/-} ratas todos los parámetros se vieron significativamente afectados; disminuye en E, M, I e IR, aumenta en LE, LM y LI. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en ningún parámetro entre ratas SERT^{+/+} y SERT^{-/-}. La combinación de tramadol (20 mg/kg) con 20 mg/kg de naloxona, en comparación con el vehículo, indujo disminuciones significativas en E, M e I y aumentos significativos en LM y LI en ratas SERT^{+/+}, mientras que en ratas SERT^{-/-} E y I se redujeron significativamente. Los efectos sobre I, LM y LI fueron significativamente más fuertes en los animales SERT^{+/+} en comparación con los animales SERT^{-/-}. La combinación de 0.3 mg/kg WAY100,635 + 20 mg/kg de naloxona + 20 mg/kg de tramadol abolió por completo el comportamiento sexual en ratas SERT^{+/+} y SERT^{-/-} (figura 6).

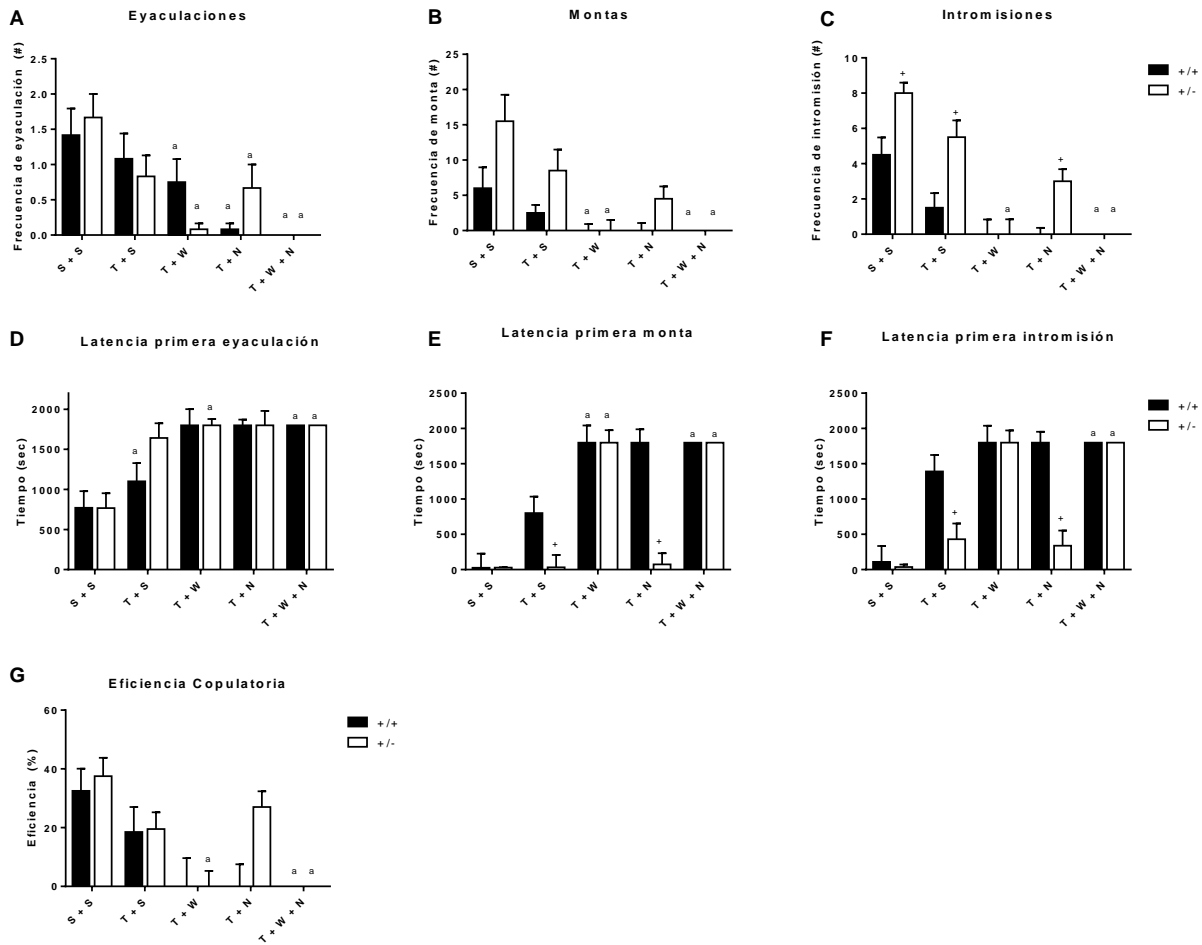


Figura 5. Comportamiento sexual de ratas macho (N = 12/grupo) tratadas con solución salina + solución salina (S + S), tramadol (20 mg/kg) + solución salina (T + S), tramadol (20 mg/kg) + WAY100,635 (0.3 mg/kg) (T + W), tramadol (20 mg/kg) + Naloxona (20 mg/kg; T + N) y tramadol (20 mg/kg) + WAY100,635 (0.3 mg/kg) + Naloxona (20 mg/kg; T + W + N). El número y la latencia de las eyacuaciones por 30 min (A, D), el número y la latencia de las montas (B, E), el número y la latencia de las intromisiones (C, F) y la relación de intromisión (G). Los análisis estadísticos detallados (prueba de Friedman) se muestran en las Tablas Supl.7 y 8. a: diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación con S + S. +: diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los grupos SERT^{+/+} y SERT^{-/-}.

4. Discusión

Cuando se administra de forma aguda (IP), las dosis bajas de tramadol (5 y 10 mg/kg) no tienen efectos significativos sobre el comportamiento sexual de las ratas macho SERT^{+/+}, SERT^{+/-} y SERT^{-/-}, seleccionadas para niveles normales de eyacuación (alrededor 2-3 eyacuaciones/prueba). La dosis de 20 mg/kg de tramadol estaba claramente en el límite de relevancia farmacológica. Se observaron algunos efectos menores, pero inconsistentes. A dosis de 40 y 50 mg/kg, el tramadol

inhibió significativamente el rendimiento sexual de todos los genotipos SERT, con el efecto más fuerte en la dosis de 50 mg/kg que casi lo redujo a cero. Estos hallazgos esencialmente replicaron nuestros hallazgos anteriores sobre los efectos del tramadol en el comportamiento sexual masculino en ratas (Olivier et al., 2017). Intentamos comprender mejor si los efectos del tramadol sobre el comportamiento sexual son consecuencia de los efectos inhibidores de la recaptación de 5-HT del tramadol y/o la acción sobre el receptor de opiáceos μ . En investigaciones previas de nuestro grupo de investigación, realizadas solo en ratas Wistar de tipo salvaje (Olivier et al., 2017), se planteó la hipótesis de que los efectos inhibitorios sobre el comportamiento sexual después de la administración aguda de tramadol se debían principalmente a sus propiedades ISRS, pero no podían excluir a papel para el receptor opioide μ (Olivier et al., 2017). Decidimos probar el tramadol también en ratas noqueadas a SERT (animales noqueados heterocigotos y homocigóticos) para excluir el componente SSRI en el mecanismo de acción del tramadol en sus efectos inhibidores sexuales. Debido a que los efectos de todos los fármacos y dosis utilizados (tramadol, WAY100,635, naloxona y combinaciones) en ratas SERT^{+/-} heterocigóticas no se desviaron esencialmente de aquellos en SERT^{+/+}, no utilizamos los datos de SERT^{+/-}, pero toda la información se proporciona en los datos suplementarios.

Sorprendentemente, el tramadol tuvo acciones inhibitorias comparables sobre el comportamiento sexual en ratas SERT^{+/+} y SERT^{-/-} (figura 2). Esperábamos que el tramadol ejerciera menos efectos inhibitorios sobre el comportamiento sexual en las ratas SERT^{-/-} debido a la ausencia de cualquier molécula SERT en este genotipo (Homberg et al., 2007). Aparentemente, el otro mecanismo principal de acción presente en el tramadol, el agonismo para el receptor de opiáceos μ , podría haber causado la acción sexual inhibitoria en las ratas noqueadas. De ser así, se esperaba que la naloxona, un antagonista del receptor de opiáceos μ , antagonizaría la disminución inducida por tramadol en el

comportamiento sexual en ratas SERT^{-/-}. Sin embargo, la dosis de 20 mg/kg de naloxona, que tuvo efectos limitados (solo inhibición de la frecuencia de la eyaculación) en ratas SERT^{-/-} por sí sola (experimento 3; figura 4), no fue capaz de antagonizar el efecto del tramadol en la frecuencia de eyaculación ni tuvo ningún efecto inhibitor adicional sobre otros parámetros sexuales. En realidad, esta dosis de naloxona combinada con tramadol (20 mg/kg) no cambió el comportamiento de manera consistente en comparación con la naloxona sola. Esto sugiere que la sensibilidad del sistema opioide μ en el cerebro de las ratas SERT^{-/-} no había cambiado debido a la ausencia de SERT durante la vida del animal. No se han publicado datos en ratas SERT^{-/-} sobre la sensibilidad del sistema opioide, pero en ratones SERT^{-/-} se sugiere que la sensibilidad farmacológica a los efectos analgésicos de la morfina no ha sido alterada (Hall et al., 2011). Sorprendentemente, la naloxona (figura 3) tuvo, en todas las dosis probadas en el estudio de dosis-respuesta (5-20 mg/kg), pero también en el estudio de dosis única (figura 5), un efecto muy consistente pero no dependiente de la dosis en la frecuencia de eyaculación en las ratas SERT^{-/-}, pero no así en los machos SERT^{+/+}. En nuestros estudios previos de tramadol en ratas Wistar de tipo salvaje (Olivier et al., 2017), 5 y 10 mg/kg de naloxona no tuvieron ningún efecto sobre el comportamiento sexual de las ratas macho, mientras que 20 mg/kg de naloxona tuvo un efecto más inhibitorio sobre el comportamiento sexual que en los presentes experimentos. Aunque en el estudio anterior (Olivier et al., 2017) hubo alguna evidencia de que una dosis relativamente baja de naloxona (10 mg/kg) antagonizó de manera marginal algunos parámetros del comportamiento sexual (LM y LE) después de una dosis alta de tramadol (50 mg/kg) que redujeron todos los parámetros de comportamiento sexual, no repetimos este experimento en los presentes estudios porque los datos emergentes no apuntaban a una fuerte influencia del sistema opioide en los efectos del tramadol sobre el comportamiento sexual. Otros ligandos con actividad agonista del receptor de opiáceos μ como la morfina que inhiben el

comportamiento sexual masculino en ratas (Ågmo & Paredes, 1988; McIntosh et al., 1980) podrían ser, dependientes de la dosis y completamente, antagonizados por la naloxona. Además, como en nuestras manos, la actividad intrínseca de la naloxona en el comportamiento sexual de la rata macho no está clara (Gessa et al., 1979; McIntosh et al., 1980; Myers & Baum, 1979), habiéndose reportado tanto efectos estimulantes como inhibitorios. Aparentemente, otros factores que contribuyen a los efectos inhibitorios del tramadol en las actividades sexuales masculinas son probablemente más importantes que la contribución del sistema opioide.

Como se sugirió en nuestro estudio anterior (Olivier et al., 2017), creemos que los efectos inhibitorios del tramadol sobre el comportamiento sexual masculino en los animales SERT^{+/+} se deben principalmente (si no exclusivamente) al bloqueo del transportador de serotonina. Cuando en ratas SERT^{+/+} una dosis aguda (20 mg/kg) de tramadol que no tiene efectos consistentes sobre el comportamiento sexual, se combina con 0.3 mg/kg WAY100,635, un antagonista del receptor 5-HT_{1A} que tampoco afecta el comportamiento sexual por sí solo (figura 5), el comportamiento sexual se inhibe, lo que confirma nuestros datos anteriores (Olivier et al., 2017). Se postula que la acción inhibitoria de los ISRS sobre el comportamiento sexual masculino está mediada por los receptores 5-HT_{1A} (de Jong et al., 2005; Olivier et al., 2011). Se ha reportado (Bloms-Funke et al., 2011) que el componente SSRI en tramadol conduce a niveles elevados de las concentraciones extracelulares de 5-HT en el cerebro. En realidad, el enantiómero (+) y su metabolito (+) - M₁ del tramadol tienen efectos inhibidores de la recaptura de serotonina, mientras que el enantiómero (-) y su metabolito (-) - M₂ tienen efectos inhibidores de la recaptura de noradrenalina (Matthiesen et al., 1998). El último enantiómero causa los niveles de noradrenalina extracelular mejorados debido al bloqueo de la NET (Bloms-Funke et al., 2011). Los ISRS apenas mejoran la 5-HT después de la administración aguda, v.g. en la corteza frontal (Beyer et al., 2002; Beyer & Cremers, 2008). Este fenómeno posiblemente

causa la falta de efectos inhibitorios sexuales de los ISRS después de la administración aguda (Olivier et al., 2017b). No se han realizado experimentos farmacológicos con los enantiómeros (+) - y (-) de tramadol, pero podrían ser útiles para determinar aún más el papel de las propiedades de absorción noradrenérgica frente a serotoninérgica del tramadol en el comportamiento sexual. Agregar un antagonista del receptor 5-HT_{1A} a un ISRS conduce a niveles agudos mejorados de 5-HT en el cerebro (Beyer et al., 2002). Estos niveles mejorados de 5-HT muy probablemente conducen a una inhibición aguda y dependiente de la dosis del comportamiento sexual masculino por ISRS (de Jong et al., 2005; Olivier et al., 2010b; Olivier et al., 2017). Nuestros hallazgos con tramadol están en línea con los datos del ISRS. Dosis más bajas de tramadol tienen efectos potenciadores relativamente pequeños sobre los niveles extracelulares de 5-HT en el hipocampo ventral, pero dosis más altas tienen efectos potenciadores considerables (Bloms-Funke et al., 2011), asociados con efectos inhibidores sexuales a altas dosis de tramadol en nuestro presente estudio. La dosis de 20 mg / kg de tramadol no tiene o tiene efectos inhibitorios sexuales muy limitados, pero en combinación con 0.3 mg/kg WAY100,635, se encuentran potentes efectos inhibitorios. Estos datos sugieren fuertemente, en analogía con los ISRS, que el tratamiento crónico con tramadol en ratas de tipo salvaje conducirá a la inhibición del comportamiento sexual de las mismas.

Como se mostró anteriormente (Chan et al., 2011) y replicado en este trabajo, las ratas SERT^{-/-}, pero no las ratas SERT^{+/-}, tienen un nivel basal más bajo de comportamiento sexual. Debido a que queríamos estudiar drogas en animales con niveles basales comparables de rendimiento sexual, seleccionamos los machos SERT^{-/-} con mejor rendimiento (N=12) del grupo de entrenamiento (N=31) después de 6 sesiones de entrenamiento semanales de 30 min (figura 1) En todos los experimentos farmacológicos (figuras 2- 5) los datos del vehículo de estos animales SERT^{-/-} nunca se desviaron significativamente de los machos SERT^{+/+}, lo que indica la estabilidad de los dos

genotipos a lo largo del tiempo. Sorprendentemente, las ratas SERT^{+/-} nunca se desviaron en ningún aspecto o bajo ningún tratamiento farmacológico de las ratas SERT^{+/+}, confirmando datos anteriores (Chan et al., 2011). El nivel basal de comportamiento sexual en ratas SERT^{-/-} es comparable al de las ratas tratadas crónicamente con ISRS (de Jong et al., 2005; de Jong et al., 2005b; de Jong et al., 2006; Olivier et al., 2017b). La administración aguda de ISRS a dosis que alcanzan > 80% de ocupación SERT, no induce de manera confiable la inhibición de la conducta sexual. Probablemente, las adaptaciones (disminución de la regulación) en los SERT ocurren después del tratamiento crónico con ISRS que subyace al cambio en el rendimiento sexual (Oosting et al., 2016). Las ratas SERT^{-/-} muestran alteraciones en la señalización serotoninérgica y la homeostasis (Homberg et al., 2007), que incluyen niveles de tejido 5-HT muy reducidos y liberación de 5-HT inducida por despolarización. Los niveles basales extracelulares de 5-HT aumentaron nueve veces, mientras que no se encontraron adaptaciones importantes en otros sistemas monoaminérgicos (noradrenalina y sistemas dopaminérgicos). La ausencia constitutiva de la SERT conduce a varias adaptaciones en el sistema serotoninérgico, donde en particular las adaptaciones de los receptores 5-HT_{1A} están presentes (Homberg et al., 2008; Olivier et al., 2008). Estudios anteriores en ratas SERT^{-/-} con respecto al comportamiento sexual masculino (Chan et al., 2011) sugirieron que la ausencia de SERT durante toda la vida podría tener efectos diferenciales en dos grupos diferentes de receptores 5-HT_{1A}. Un grupo de receptores 5-HT_{1A} con sensibilidad inalterada parece mediar los efectos pro sexuales de los agonistas del receptor 5-HT_{1A} como 8-OH-DPAT (Chan et al., 2011), mientras que el otro grupo, mediando los efectos inhibitorios del bloqueo, los receptores 5-HT_{1A} aparecen sensibilizados en las ratas SERT^{-/-} (Chan et al., 2011). Este complejo de dos conjuntos de receptores 5-HT_{1A} regulados diferencialmente en ratas SERT^{-/-} también se ha encontrado en la regulación autónoma de la temperatura corporal y las respuestas al estrés (Olivier et al., 2008). Este

conjunto de receptores 5-HT_{1A} sensibilizados conduce a una respuesta mejorada a WAY100,635, que se confirmó en el presente estudio. WAY100,635 no tuvo efectos de comportamiento en las ratas SERT^{+/+}, pero inhibió (y algo dependiente de la dosis) el comportamiento sexual masculino a todas las dosis en ratas SERT^{-/-}. La combinación de tramadol y WAY100,635 a dosis que por sí mismas no tuvieron efectos sobre el comportamiento sexual en ratas SERT^{+/+}, condujo a la inhibición del comportamiento sexual en animales SERT^{+/+} y SERT^{-/-}, aunque más fuertes (pero no significativamente) en ratas SERT^{-/-} (figura 5). Aparentemente, en ratas SERT^{+/+}, agregar un efecto SSRI (en tramadol) al bloqueo de los receptores 5-HT_{1A} en sí mismo conduce a la inhibición sexual, mientras que la combinación de tramadol + WAY100,635 en animales SERT^{-/-} no inhibe más que WAY100,635 solo.

La combinación de tramadol (20 mg/kg) + naloxona (20 mg/kg) + WAY100,635 (0.3 mg/kg) condujo a una inhibición severa del comportamiento sexual en ratas SERT^{+/+} y SERT^{-/-} (figura 5). La combinación de tramadol/WAY100,635 en ratas SERT^{+/+} ya tiene efectos inhibitorios considerables, agregando esto a una dosis de naloxona (20 mg/kg) que no es efectiva por sí misma, elimina el comportamiento sexual casi por completo. Esto también es válido para los animales SERT^{-/-}. No está claro cómo explicar esta eliminación de todos los comportamientos activos, pero podrían estar involucrados factores conductuales no específicos (sedación, trastornos motores u otros). No está claro si las interacciones farmacocinéticas pueden estar involucradas, pero el tramadol (racémico) se metaboliza ampliamente dentro del período experimental (30-60 minutos después de la inyección) y rápidamente, se forman metabolitos activos (enantiómeros + y -; Sheikholeslami et al., 2016). En nuestros experimentos, la dosis de 20 mg/kg desempeñó un papel destacado en nuestros estudios de comportamiento, y esta dosis (Sheikholeslami et al., 2016) condujo a niveles de plasma y líquido cefalorraquídeo (LCR) de (+ y - tramadol) y M₁ y M₂

metabolitos que alcanzaron rápidamente los niveles pico de plasma y LCR; los niveles plasmáticos de todos los componentes estuvieron al menos a un nivel alto constante durante los primeros 60 minutos (Sheikholeslami et al., 2016), el tiempo que llevamos a cabo nuestros experimentos. Sin embargo, es posible que una combinación de tramadol con naloxona y/o WAY100,635 haya provocado interacciones farmacocinéticas, v.g. a través de la modulación de las reacciones metabólicas de fase I mediadas por CYP450 del tramadol racémico responsable de la aparición de los metabolitos activos en el comportamiento M₁ y M₂. En humanos, el metabolismo de fase I se ejecuta principalmente a través de CYP2D6 y CYP3A4 (Miotto et al., 2017). Aunque no se ha investigado exhaustivamente, parece haber una gran similitud entre el metabolismo humano y de rata del tramadol (Sheikholeslami et al., 2016). Desafortunadamente, no se conoce nada sobre la farmacocinética y el metabolismo exactos de WAY100,635, mientras que los datos sobre naloxona también son escasos, particularmente en ratas. Desafortunadamente, esto significa que no podemos concluir que los tratamientos combinados de tramadol con WAY100,635 y naloxona están influenciados por los efectos metabolizantes debido a la facilitación o inhibición de ciertos sistemas CYP450 en el hígado o el cerebro.

Finalmente, se debe considerar los efectos de recaptación de noradrenalina del tramadol. Es posible que los transportadores de noradrenalina (NET) hayan asumido (en parte) el papel de SERT para compensar la pérdida de SERT en la rata SERT^{-/-} (Olivier et al., 2011; 2017). Aunque hay evidencia de una mínima promiscuidad de la NET para 5-HT (Homberg et al., 2007), hay evidencia considerable (Olivier et al., 2011) de que las ratas SERT^{-/-} han adaptado sus sistemas catecolaminérgicos para compensar la neurotransmisión de 5-HT alterada de por vida y que los fármacos que influyen en dichos sistemas pueden tener efectos diferenciales en ratas SERT^{+/+} y SERT^{-/-}. La evidencia preliminar con atomoxetina, un inhibidor de NET, no señaló diferencias en el

comportamiento sexual en ratas $SERT^{+/+}$ y $SERT^{-/-}$ (datos no mostrados), lo que sugiere que los efectos del tramadol en ambos genotipos son en gran medida, si no exclusivamente, debidos a los cambios en el sistema serotoninérgico.

En conclusión, todos los datos recopilados hasta el momento sugieren que la acción inhibitoria del tramadol sobre el comportamiento sexual masculino se debe principalmente, si no exclusivamente, al bloqueo del transportador de serotonina, un mecanismo que también en los ISRS es responsable de su acción inhibitoria sobre la latencia de eyaculación en varones con eyaculación precoz.

Datos suplementarios

Figura Supl. 1. Efectos del tramadol en ratas macho SERT^{+/-}. N = 12 animales/grupo.

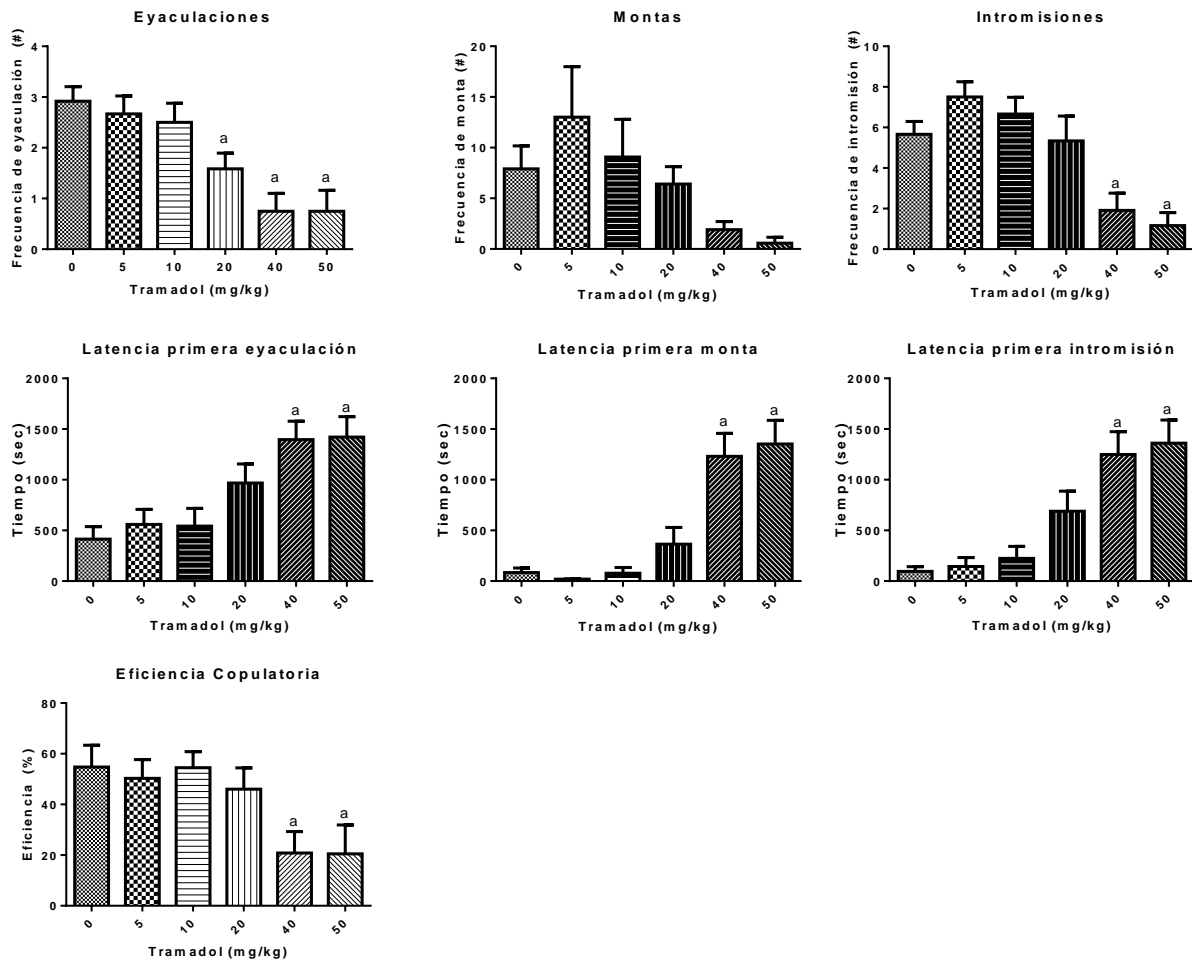


Figura Sup. 1. Comportamiento sexual de ratas macho SERT^{+/-} (N = 12/grupo) tratadas con 0, 10, 20, 40 o 50 mg/kg de tramadol. Los datos se expresan como la media \pm SEM. Se proporciona el número y la latencia de las eyaculaciones por 30 min (A, D) y la latencia de las montas (B, E), el número y la latencia de las intrusiones (C, F) de la primera serie de eyaculación. Los análisis estadísticos detallados (ANOVA de medidas repetidas) se muestran en la tabla supl. 9. a: diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación con el grupo de solución salina.

Figura Supl. 2. Efecto de WAY100,635 en ratas macho SERT^{+/-}. N = 12 animales/grupo

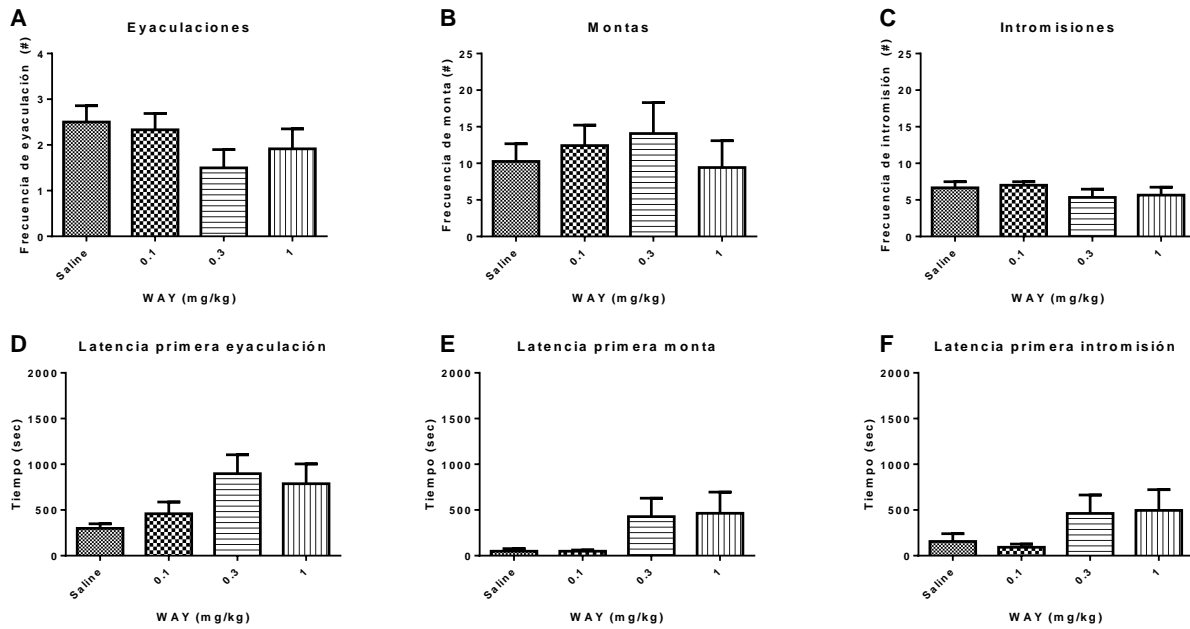


Figura Sup. 2. Comportamiento sexual de ratas macho SERT^{+/-} (N = 12/grupo) tratadas con solución salina, WAY100,635 0.01 mg/kg, WAY100,635 0.03 mg/kg o WAY100,635 3 mg/kg. Los datos se expresan como media ± SEM. Se muestran el número y la latencia de las eyaculaciones por 30 min (A, D), el número y la latencia de las montas (B, E), el número y la latencia de las intromisiones (D, F). Los análisis estadísticos detallados (ANOVA de medidas repetidas) se muestran en la tabla supl. 10. a: diferencia significativa (p < 0.05) en comparación con el grupo de solución salina.

Figura Supl. 3. Efecto de la naloxona en ratas macho Wistar SERT^{+/-}. N = 12 animales/grupo.

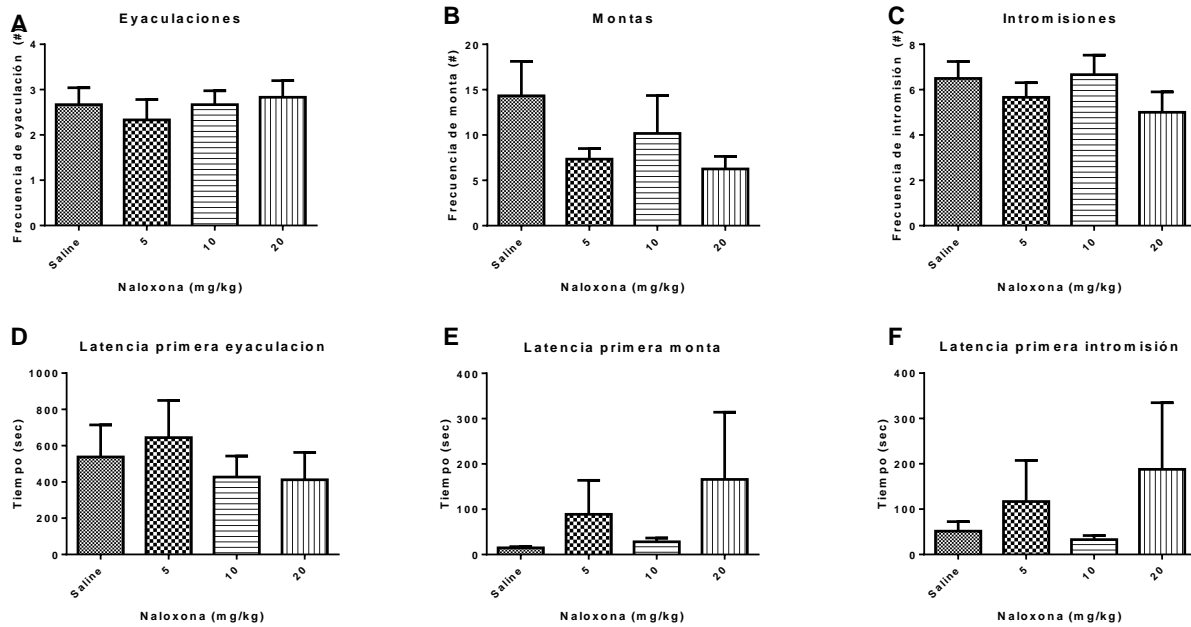


Figura Sup. 3. Comportamiento sexual de ratas macho SERT^{+/-} (N = 12/grupo) tratadas con solución salina, naloxona 5 mg/kg, naloxona 10 mg/kg o naloxona 20 mg/kg. Los datos se representan como la media \pm SEM. Se muestran el número y la latencia de las eyaculaciones por 30 min (A, D), el número y la latencia de las montas (B, E), el número y la latencia de las intromisiones (C, F). Los análisis estadísticos detallados (medidas repetidas ANOVA) se muestran en la Tabla Supl. 11. a: diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación con el grupo de solución salina.

Figura Supl. 4. Efectos de WAY100,635 + naloxona + tramadol en ratas macho Wistar SERT^{+/-}. N = 12 animales/grupo.

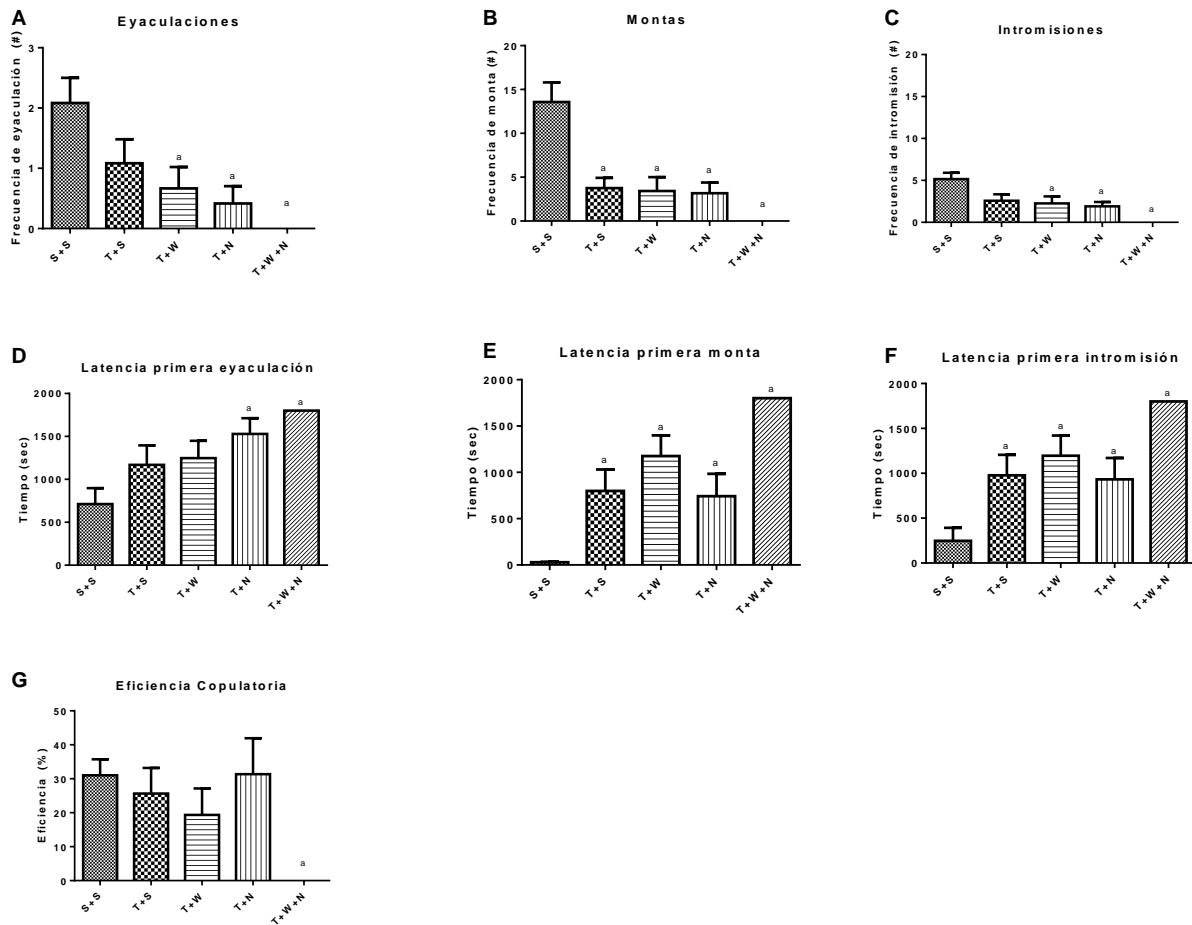


Figura Sup. 4. Comportamiento sexual de SERT^{+/-} ratas macho (N = 12/grupo) tratadas con solución salina + solución salina (S + S), tramadol (20 mg/kg) + solución salina (T + S), tramadol (20 mg/kg) + WAY100,635 (0.3 mg/kg; T + W), tramadol (20 mg/kg) + naloxona (20 mg/kg; T + N) y tramadol (20 mg/kg) + WAY100,635 (0.3 mg/kg) + naloxona (20 mg/kg; T + W + N). Se muestran el número y la latencia de las eyaculaciones por 30 min (A, D), el número y la latencia de las montas (B, E), el número y la latencia de las intromisiones (C, F) y la relación de intromisión (G). Los análisis estadísticos detallados (ANOVA de medidas repetidas) se muestran en la tabla supl. 12. a: diferencia significativa (p < 0.05) en comparación con solución salina + solución salina.

Tabla Supl. 1: Rendimiento del comportamiento sexual a lo largo del tiempo de ratas macho Wistar SERT^{+/+}, SERT^{+/-} y SERT^{-/-}.

Geno-tipo	Semana									ANOVA medidas repetidas
	1	2	3	4	5	6	7-13	14-18	19-25	
	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	
	A	B	C	D	E	F	G	H		

SERT										
+/+	0.0±0.0	0.3±0.1	1.0±0.3 A,B	2.1±0.2 A,B	1.9±0.2	1.1±0.2	1.9±0.2 A,B	2.1±0.3 A,B	3.1±0.2 A,B,C,E, F,G	F _(8,88) =15.23; P<0.0001
+/-	0.5±0.2	0.6±0.2	1.6±0.3	2.1±0.2 A,B	1.8±0.2	1.2±0.3	2.9±0.2 A,B,F	2.5±0.3 A,B	2.6±0.3 A,B,F	F _(8,88) = 8.94; P<0.0001
-/-	0.4±0.1	0.1±0.0	0.7±0.2	1.1±0.2	1.5±0.1 A,B	1.5±0.2 A,B	1.4±0.3 B	1.6±0.3 A,B	2.8±0.2 A,B,C,D ,E,F,G, H	F _(8,88) = 14.05; P<0.0001
ANOVA 2 vías	ns	ns	ns	ns	ns	ns	P<0.001	ns	ns	F _(8,297) = 28.05; P<0.001

Durante las primeras 6 semanas (entrenamiento: una prueba/semana) se proporcionan datos de animales seleccionados (SERT^{+/+} n=12, SERT^{+/-} n=12 y SERT^{-/-} n=12). En este último caso, se proporciona la media (±SEM) de los tratamientos con vehículo en los tres experimentos.

Tabla Supl. 2: Porcentaje en animales que realizan parámetros de comportamiento sexual durante la administración de fármacos en ratas macho Wistar SERT^{+/+} SERT^{-/-} y SERT^{+/-}. N = 12/grupo.

Dosis de tramadol, mg/kg	Parámetros	0 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg	40 mg/kg	50 mg/kg
Genotipo SERT		%	%	%	%	%	%
+/+	<i>Eyaculación</i>	91.6	100	100	58.3	33.3	0
-/-		75	91.6	100	66.6	25	0
+/-		100	91.6	100	83.3	33.3	25
+/+	<i>Monta</i>	100	100	100	75	41.6	0
-/-		100	100	100	100	41.6	33.3
+/-		100	100	100	91.6	41.6	8.3
+/+	<i>Intromisión</i>	100	100	100	75	41.6	0
-/-		100	91.6	100	91.6	25	33.3
+/-		100	100	100	83.3	41.6	25
Dosis de naloxona, mg/kg	Parámetros	0 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg		
Genotipo SERT		%	%	%	%		
+/+	<i>Eyaculación</i>	100	91.6	100	100		
-/-		100	91.6	100	100		
+/-		100	91.6	100	91.6		
+/+	<i>Monta</i>	100	100	100	100		
-/-		100	100	100	100		
+/-		100	100	100	91.6		

+/+	<i>Intrromisión</i>	100	91.6	100	100	
-/-		100	100	100	100	
+/-		100	100	100	91.6	
Dosis de WAY100,635, mg/kg	Parámetros	0 mg/kg	0.1 mg/kg	0.3 mg/kg	1 mg/kg	
Genotipo SERT		%	%	%	%	
+/+	<i>Eyaculación</i>	75	83.3	66.6	66.6	
-/-		91.6	33.3	25	16.6	
+/-		91.6	91.6	66.6	66.6	
+/+	<i>Monta</i>	91.6	100	91.6	75	
-/-		100	91.6	41.6	25	
+/-		91.6	100	83.3	83.3	
+/+	<i>Intrromisión</i>	91.6	100	75	83.3	
-/-		91.6	75	41.6	25	
+/-		91.6	100	83.3	83.3	
Dosis de fármaco, mg/kg	Parámetros	0 mg/kg (salina + salina)	20 mg/kg Tramadol + Salina	20 mg/kg Tramadol + WAY 100,635	20 mg/kg Tramadol + Naloxona	20 mg/kg Tramadol + WAY 100,635 + Naloxona
Genotipo SERT		%	%	%	%	%
+/+	<i>Eyaculación</i>	58.3	50	33.3	8.3	0
-/-		83.3	50	8.3	33.3	0
+/-		83.3	41.6	33.3	16.6	0
+/+	<i>Monta</i>	83.3	66.6	25	33.3	0
-/-		100	91.6	25	91.6	0
+/-		100	66.6	41.6	50	0
+/+	<i>Intrromisión</i>	83.3	50	41.6	16.6	0
-/-		100	66.6	16.6	75	0
+/-		100	58.3	58.3	58.3	0

Tabla Supl. 3: Efectos de tramadol sobre el comportamiento sexual de ratas macho Wistar SERT^{+/+}. N = 12/grupo.

Dosis de tramadol, mg/kg	0 mg/kg A	5 mg/kg B	10 mg/kg C	20 mg/kg D	40 mg/kg E	50 mg/kg	ANOVA de medidas repetidas (significancia)
Parámetros medidos	Media± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	
# E	1.9±0.2	2.8±0.2	2.1±0.1	1.4±0.4 B	0.5±0.2 A,B,C	0.0±0.0 A,B,C,D	F _(5,11) =17.29; P<0.0001
Latencia 1ª M (s)	119.8±102.8	98.5±48.	99.1±61.6	692.8±222.1 A	1217±238 A,B,C	1795±5.3 A,B,C,D	F _(5,11) =24.38; P<0.0001

Latencia 1ª I (s)	249.9±147	161.9±84.2	229.3±106.2	843.6±214.5 A,B	1249±225.5 A,B,C	1795±5.3 A,B,C,D	F _(5,11) =18.26; P<0.0001
# M 1ª serie	14.5±1.8	9.4±2.3	12.5±2.6	7.5±2.8 B	3.3±1.6 A,C	0.0±0.0 A,B,C	F _(5,11) =8.136; P<0.0001
# I 1ª serie	7.8±1.0	8.9±0.9	7.6±0.8	3.6±0.8 A	2.8±1.0 A,B,C	0.0±0.0 A,B,C	F _(5,11) =14.61; P<0.0001
Latencia 1ª E (s)	773.9±142	448.4±92.4	714.9±115.1	1107±195.3 B	1503±133.6 A,B,C	1800±0.0 A,B,D	F _(5,11) =17.21; P<0.0001
PEI	425.9±22.9	394.6±23.6	440.4±21.6	399.7±56.8	493.3±53.6	-----	-----
CE ₁	34.0±4.8	54.9±6.3	43±5.2	37.9±9.6	21.8±8.4 B	8.3±8.3 B,C	F _(5,11) =4.65;P=0.0013

M = monta; I = intromisión; E = eyaculación; PEL = intervalo post eyaculatorio; # = número; CE = eficiencia copulatoria = [# intromisiones / (# intromisiones + # montas)] * 100. A = Significativamente (p <0.05) diferente de 0 mg/kg. B = Significativamente (p <0.05) diferente de 5 mg/kg. C = Significativamente (p <0.05) diferente de 10 mg/kg. D = Significativamente (p <0.05) diferente de 20 mg/kg. E = Significativamente (p <0.05) diferente de 40 mg/kg.

Tabla Supl. 4: Efectos del tramadol en el comportamiento sexual de ratas macho Wistar SERT^{-/-}. N = 12/grupo.

Dosis de tramadol, mg/kg	0 mg/kg A	5 mg/kg B	10 mg/kg C	20 mg/kg D	40 mg/kg E	50 mg/kg	ANOVA de medidas repetidas (significancia)
Parámetros medidos	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	
# E	1.4±0.3	1.9±0.3	1.6±0.2	1.0±0.29	0.4±0.2 B,C	0.0±0.0 A,B,C,D	F _(5,11) =9.64; P<0.0001
Latencia 1ª M (s)	91.7±80.1	11.4±2.2	12.1±4.4	184.1±109.2	1165±220 A,B,C	1316±225.5 A,B,C,D	F _(5,11) =17.88; P<0.0001
Latencia 1ª I (s)	290.8±150	186.7±147.2	141.3±98.3	386.4±152.9	1445±189.7 A,B,C,D	1469±198 A,B,C,D	F _(5,11) =17.98; P<0.0001
# M 1ª serie	21.1±4.5	13.3±1.3	19.7±5.6	9.9±2.26	3.5±1.4 A,C	1.8±1.4 A,C	F _(5,11) =6.58; P<0.0001
# I 1ª serie	7.4±0.8	8.5±1.04	8.5±0.8	7.1±1.07	2.0±1.0 A,B,D	1.0±0.5 A,B,D	F _(5,11) =15.35; P<0.0001
Latencia 1ª E (s)	1062±162.6	840.6±141.6	939.5±1607	1180±163.3	1630±103.1 A,B,C	1800±0.0 A,B,C,D	F _(5,11) =9.16; P<0.0001
PEI	485.6±28.2	476.3±36.5	503.2±22.2	521.5±58.44	506.1±90.6	-----	-----

CE_1	31.3±4.5	37.3±4.0	40.7±5.5	43.2±6.15	11.3±5.9 C,D	20.8±10.1	F(5,11)=4.16;P=0.0028
--------	----------	----------	----------	-----------	-----------------	-----------	-----------------------

M = monta; I = intromisión; E = eyaculación; PEL = intervalo post eyaculatorio; # = número; CE = eficiencia copulatoria = [# intromisiones / (# intromisiones + # montas)] * 100. A = Significativamente (p <0.05) diferente de 0 mg/kg. B = Significativamente (p <0.05) diferente de 5 mg/kg. C = Significativamente (p <0.05) diferente de 10 mg/kg. D = Significativamente (p <0.05) diferente de 20 mg/kg. E = Significativamente (p <0.05) diferente de 40 mg/kg.

Tabla Supl. 5: Efectos de WAY100,635 en el comportamiento sexual de ratas macho Wistar SERT^{+/+}. N = 12/grupo.

Dosis de WAY100,635 mg/kg	0 mg/kg A	0.1 mg/kg B	0.3 mg/kg C	1 mg/kg	ANOVA de medidas repetidas (significancia)
Parámetros medidos	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	
# E	2.08±0.3	1.7±0.3	1.7±0.4	1.58±0.3	F(3,11)=0.44; P=0.7246
Latencia 1ª M (s)	219.0±151.6	94.1±30.7	356.8±195	358.8±196.1	F(3,11)=1.22; P=0.3178
Latencia 1ª I (s)	230.3±151.4	196.9±70.1	523.7±206.6	561.2±224.2	F(3,11)=1.86; P=0.1542
# M 1ª serie	12.7±2.6	15.58±4.4	10.8±2.4	11.5±3.9	F(3,11)=0.33; P=0.8025
# I 1ª serie	6.8±0.8	7.6±0.9	4.8±1.0	5.2±1.2	F(3,11)=1.75; P=0.1746
Latencia 1ª E (s)	637.8±137	963.3±185.4	901.9±201.3	1056±202.9	F(3,11)=1.64; P=0.1980
PEI	335.6±40.6	438.8±45.2	359.1±34.9	378.9±15.9	F(3,11)= 1.46; P=0.2440
CE ₁	35.7±4.9	43.4±6.2	26.5±6.3	28.7±6.3	F(3,11)=3.14;P=0.381

M = monta; I = intromisión; E = eyaculación; PEL = intervalo post eyaculatorio; # = número; CE = eficiencia copulatoria = [# intromisiones / (# intromisiones + # montas)] * 100. A = Significativamente (p <0.05) diferente de 0 mg/kg. B = Significativamente (p <0.05) diferente de 0.1 mg/kg. C = Significativamente (p <0.05) diferente de 0.3 mg/kg.

Tabla Supl. 6: Efectos de WAY100,635 sobre el comportamiento sexual de ratas macho Wistar SERT^{-/-}. N = 12/grupo.

Dosis de WAY100,635 mg/kg	0 mg/kg A	0.1 mg/kg B	0.3 mg/kg C	1 mg/kg	ANOVA de medidas repetidas (significancia)
Parámetros medidos	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	
# E	1.6±0.3	0.5±0.2 A	0.4±0.2 A	0.3±0.2 A	F(3,11)=6.95; P=0.0009

<i>Latencia 1ª M (s)</i>	13.9±3.9	381.1±199.4	995.9±254.9 A	1502±200.9 A,B	F _(3,11) =13.41; P=0.0001
<i>Latencia 1ª I (s)</i>	173.2±148.1	595.3±219.4	1049±237.1 A	1505±198.9 A,B	F _(3,11) =10.68; P=0.0001
<i># M 1ª serie</i>	12.5±1.3	15.2±3.4	8.3±4.1	2.3±1.5 A,B	F _(3,11) =5.02; P=0.0056
<i># I 1ª serie</i>	8.2±1.1	4.8±1.2	2.5±1.1 A	1.1±0.7 A,B	F _(3,11) =8.97; P=0.0002
<i>Latencia 1ª E (s)</i>	769.8±136.8	1549±117.6 A	1569±123.2 A	1590±124.6 A	F _(3,11) =8.27; P=0.0003
<i>PEI</i>	471.5±45.7	459.5±139.5	383.5±16.5	310.0±0.0	----- -
<i>CE₁</i>	37.8±4.206	18.0±3.7 A	11.0±4.8 A	9.3±6.0 A	F _(3,11) =9.26; P=0.0001

M = monta; I = intromisión; E = eyaculación; PEL = intervalo post eyaculatorio; # = número; CE = eficiencia copulatoria = [# intromisiones / (# intromisiones + # montas)] * 100. A = Significativamente (p <0.05) diferente de 0 mg/kg. B = Significativamente (p <0.05) diferente de 0.1 mg/kg. C = Significativamente (p <0.05) diferente de 0.3mg/kg.

Tabla Supl. 7: Efectos de la naloxona en el comportamiento sexual de ratas macho Wistar SERT^{+/+}. N = 12/grupo.

Dosis de Naloxona, mg/kg	0 mg/kg A	5 mg/kg B	10 mg/kg C	20 mg/kg	ANOVA de medidas repetidas (significancia)
Parámetros medidos	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	
<i># E</i>	3.1±0.2	2.0±0.2 A	2.6±0.2	2.7±0.1	F _(3,11) =5.14; P=0.0050
<i>Latencia 1ª M (s)</i>	10.0±1.4	179.5±135.4	20.2±5.7	23.5±6.1	F _(3,11) =1.46; P=0.2430
<i>Latencia 1ª I (s)</i>	58.9±22.1	223.9±147.3	71.5±38.2	35.0±6.5	F _(3,11) =1.35; P=0.2741
<i># M 1ª serie</i>	10.3±2.1	9.8±2.9	7.6±1.6	5.3±0.8	F _(3,11) =1.61; P=0.2040
<i># I 1ª serie</i>	6.0±0.8	7.0±1.0	6.8±0.6	6.0±0.3	F _(3,11) =0.52; P=0.6664
<i>Latencia 1ª E (s)</i>	315.7±68.6	610.8±140.1 A	400.7±72.4	413.8±79.1	F _(3,11) =3.55; P=0.0246
<i>PEI</i>	324.1±17.3	410.4±33.8	386.3±18.7	385.8±25.8	F _(3,11) = 2.35; P=0.0860
<i>CE₁</i>	40.3±4.5	44.6±5.6	51.7±5.1	56.0±3.2 A	F _(3,11) =5.00; P=0.0057

M = monta; I = intromisión; E = eyaculación; PEL = intervalo post eyaculatorio; # = número; CE = eficiencia copulatoria = [# intromisiones / (# intromisiones + # montas)] * 100. A = Significativamente (p <0.05) diferente de 0 mg/kg. B = Significativamente (p <0.05) diferente de 5 mg/kg. C = Significativamente (p <0.05) diferente de 10 mg/kg.

Supl. tabla 8: Efectos de la naloxona en el comportamiento sexual de ratas macho Wistar SERT^{-/-}. N = 12 / grupo

Dosis de Naloxona, mg/kg	0 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg	ANOVA de medidas repetidas (significancia)
Parámetros medidos	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	
# E	2.8±0.2	1.9±0.2 A	2.0±0.1 A	1.9±0.1 A	F _(3,44) =5.31; P=0.0042
Latencia 1ª M (s)	8.7±1.6	22.0±10.4	9.5±1.9	9.7±1.6	F _(3,44) =1.32; P=0.2844
Latencia 1ª I (s)	15.7±4.1	39.5±15.2	54.4±20.6	22.4±12.4	F _(3,44) =1.39; P=0.2611
# M 1ª serie	10.6±1.5	8.8±1.0	8.9±1.4	8.9±1.5	F _(3,44) =0.41; P=0.742
# I 1ª serie	8.5±0.6	7.5±0.6	8.0±0.7	8.9±0.8	F _(3,44) =0.80; P=0.502
Latencia 1ª E (s)	465.6±117.2	795.5±150.7	527.1±68.9	633.8±51.7	F _(3,44) =2.62; P=0.0669
PEI	341.0±21.9	411.3±36.9	463.9±34.0	436.8±35.5	F _(3,44) = 2.68; P=0.0594
CE ₁	46.3±3.3	47.5±4.0	50.0±4.2	52.6±3.1	F _(3,44) =0.54;P=0.6573

M = monta; I = intromisión; E = eyaculación; PEL = intervalo post eyaculatorio; # = número; CE = eficiencia copulatoria = [# intromisiones / (# intromisiones + # montas)] * 100. A = Significativamente (p <0.05) diferente de 0 mg/kg. B = Significativamente (p <0.05) diferente de 5 mg/kg. C = Significativamente (p <0.05) diferente de 10 mg/kg.

Tabla Supl. 9: Efectos de WAY100,635 + naloxona + tramadol en ratas macho Wistar SERT^{+/+}. N = 12 animales/grupo.

Dosis de fármaco, mg/kg IP	0 mg/kg (salina + salina) A	20 mg/kg Tramadol + Salina B	20 mg/kg Tramadol + WAY 100635 C	20 mg/kg Tramadol + Naloxona D	20 mg/kg Tramadol + WAY 100635 + Naloxona	Test de Friedman significancia
Parámetros medidos	Mediana (IQR)	Mediana (IQR)	Mediana (IQR)	Mediana (IQR)	Mediana (IQR)	
# E	2.0(2.7)	0.5(2)	0.0(2) A	0.0(0) A	0.0(0.0) A	F _(4,11) =4.57; P=0.0035
Latencia 1ª M (s)	27.0(66.5)	802.0(1699)	1800(1682)	1800(869)	1800(0.0) A	F _(4,11) =20.63; P=0.0004
Latencia 1ª I (s)	108.5(1569)	1390(1576)	1800(1679)	1800(0)	1800(0.0) A	F _(4,11) =19.60; P=0.0006

# M 1ª serie	6.0(14.7)	2.5(5)	0.0(2.75) A	0.0(1.75)	0.0(0.0) A	F _(4,11) =25.31; P<0.0001
# I 1ª serie	4.5(6)	1.5(5)	0.0(5)	0.0(0)	0.0(0.0) A	F _(4,11) =18.14; P=0.0012
Latencia 1ª E (s)	771.5(1476.5)	1101(1538)	1800(1325)	1800(0)	1800(0.0) A	F _(4,11) =4.59; P=0.0034
PEI	423.0(69)	423.0(157)	467.5(325)	-----	-----	F _(2,11) =2.43; P=0.2954
CE ₁	32.5(56.5)	18.5(54.5)	0.0(44.7)	0.0(0)	0.0(0.0)	F _(4,11) =13.86; P=0.0078

M = monta; I = intromisión; E = eyaculación; PEL = intervalo post eyaculatorio; # = número; CE = eficiencia copulatoria = [# intromisiones / (# intromisiones + # montas)] * 100. A = Significativamente (p <0.05) diferente de 0 mg/kg. B = Significativamente (p <0.05) diferente de solución salina + tramadol (20 mg/kg). C = Significativamente (p <0.05) diferente del tramadol (20 mg/kg) + WAY100,635 (0.3 mg/kg). D = Significativamente (p <0.05) diferente del tramadol (20 mg/kg) + naloxona (20 mg/kg).

Tabla Supl. 10: Efectos de WAY100,635 + naloxona + tramadol en ratas macho Wistar SERT⁺. N = 12 animales/grupo.

Dosis de fármaco, mg/kg IP	0 mg/kg (salina + salina) A	20 mg/kg Tramadol + Salina B	20 mg/kg Tramadol + WAY 100635 C	20 mg/kg Tramadol + Naloxona D	20 mg/kg Tramadol + WAY 100635 + Naloxona	Test de Friedman significancia
Parámetros medidos	Mediana (IQR)	Mediana (IQR)	Mediana (IQR)	Mediana (IQR)	Mediana (IQR)	
# E	1.5(1.5)	0.5000(1.7)	0.0(0) A	0.0(1) A	0.0(0.0) A	F _(4,11) =8.57; P<0.0001
Latencia 1ª M (s)	27.5(31.5)	33.00(498)	1800(591) A,B	74.00(473)	1800(0.0) A,B,D	F _(4,11) =36.46; P<0.0001
Latencia 1ª I (s)	35.5(66.7)	430.0(1655)	1800(0) A	339.0(1488)	1800(0.0) A	F _(4,11) = 32.56; P<0.0001
# M 1ª serie	15.5(25.2)	8.5(16)	0.0(0.75) A,B	4.500(9.25)	0.0(0.0) A,B	F _(4,11) =32.02; P<0.0001
# I 1ª serie	8.0(3.2)	5.5(7)	0.0(0) A	3.0(4.75)	0.0(0.0) A,B	F _(4,11) = 31.63; P<0.0001
Latencia 1ª E (s)	767.5(1341.2)	1642(1228.7)	1800(0) A,B	1800(849.5)	1800(0.0) A,B,D	F _(4,11) =22.94; P=0.0001
PEI	411.0(6)	446.0(6)	-----	373.0(263)	-----	F _(3,11) = 0.61; P=0.7348
CE ₁	37.5(44.2)	19.5(42.7)	0.0(0) A	27.00(35.7)	0.0(0.0) A,D	F _(4,11) = 24.31; P<0.0001

M = monta; I = intromisión; E = eyaculación; PEL = intervalo posteyaculatorio; # = número; CE = eficiencia copulatoria = [# intromisiones / (# intromisiones + # montas)] * 100. A = Significativamente (plina + tramadol (20 mg/kg). C = Significativamente (p <0.05) diferente del tramadol (20 mg/kg) + WAY100,635 (0.3 mg/kg). D = Significativamente (p <0.05) diferente del tramadol (20 mg/kg) + naloxona (20 mg/kg).

Tabla Supl. 11: Efectos de Tramadol sobre el comportamiento sexual de ratas macho Wistar SERT^{+/-}. N = 12/grupo.

Dosis de tramadol, mg/kg	0 mg/kg A	5 mg/kg B	10 mg/kg C	20 mg/kg D	40 mg/kg E	50 mg/kg	ANOVA de medidas repetidas (significancia)
Parámetros medidos	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	
# E	2.9±0.2	2.6±0.3	2.5±0.3	1.5±0.3 A	0.7±0.3 A,B,C	0.7±0.4 A,B,C	F _(5,11) = 10.91; P<0.0001
Latencia 1ª M (s)	84.4±43.8	18.3±3.4	76.9±57.2	364.7±163.9	1230±227.8 A,B,C,D	1353±233.4 A,B,C,D	F _(5,11) = 17.07; P<0.0001
Latencia 1ª I (s)	95.9±46.8	144.7±87.8	223.8±118.6	688.8±197.9	1249±226.2 A,B,C	1360±229.8 A,B,C	F _(5,11) = 12.80; P<0.0001
# M 1ª serie	7.9±2.2	13.0±4.9	9.0±3.7	6.4±1.7	1.9±0.7	0.5±0.5 B	F _(5,11) = 3.00; P<0.0171
# I 1ª serie	5.6±0.6	7.5±0.7	6.6±0.8	5.333±1.233	1.917±0.84 80 A,B,C,D	1.167±0.637 6 A,B,C,D	F _(5,11) = 11.07; P<0.0001
Latencia 1ª E (s)	414.9±122.8	559.2±148.1	542.4±175.5	966.8±189.0	1396±182.6 A,B,C	1421±201.5 A,B,C	F _(5,11) = 8.64; P<0.0001
CE ₁	54.7±8.5	50.3±7.3	54.5±6.3	46.0±8.4	20.8±8.4 A,B	20.5±11.3 A,B	F _(5,11) = 5.07; P=0.0007

M = monta; I = intromisión; E = eyaculación; PEL = intervalo post eyaculatorio; # = número; CE = eficiencia copulatoria = [# intromisiones / (# intromisiones + # montas)] * 100. A = Significativamente (p <0.05) diferente de 0 mg/kg. B = Significativamente (p <0.05) diferente de 5 mg/kg. C = Significativamente (p <0.05) diferente de 10 mg/kg. D = Significativamente (p <0.05) diferente de 20 mg/kg. E = Significativamente (p <0.05) diferente de 40 mg/kg.

Tabla Supl.12: Efectos de WAY100,635 sobre el comportamiento sexual de ratas macho Wistar SERT^{+/-}. N = 12/grupo.

Dosis de WAY10065, mg/kg	0 mg/kg A	0.1mg/kg B	0.3 mg/kg C	1 mg/kg	ANOVA de medidas repetidas (significancia)
Parámetros medidos	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	
# E	2.5±0.3	2.3±0.3	1.5±0.3	1.9±0.4	F _(3,11) = 1.60; P=0.2067
Latencia 1ª M (s)	49.1±27.7	49.0±14.2	428.0±200.5	463.9±232.6	F _(3,11) = 2.98; P=0.0451
Latencia 1ª I (s)	155.9±85.6	91.8±36.0	462.4±201.2	495.1±228.2	F _(3,11) = 2.66; P=0.0638

# M 1ª serie	10.2±2.4	12.4±2.8	14.0±4.2	9.4±3.6	F(3,11)= 0.51; P=0.6781
# I 1ª serie	6.6±0.8	7.0±0.4	5.3±1.1	5.6±1.0	F(3,11)= 0.90; P=0.4497
Latencia 1ª E (s)	299.9±49.7	459.2±128.1	898.2±206.3	787.4±217.2	F(3,11)= 3.73; P=0.0205
PEI	362.5±23.5	433.1±49.9	406.8±42.6	369.0±27.9	F(3,11)= 0.82; P=0.4889
CE ₁	41.0±5.178	43.2±4.8	31.5±6.8	35.8±6.1	F(3,11)= 1.15; P=0.3428

M = monta; I = intromisión; E = eyaculación; PEL = intervalo post eyaculatorio; # = número; CE = eficiencia copulatoria = [# intromisiones / (# intromisiones + # montas)] * 100. A = Significativamente (p <0.05) diferente de 0 mg/kg. B = Significativamente (p <0.05) diferente de 0.1 mg/kg. C = Significativamente (p <0.05) diferente de 0.3mg/kg.

Tabla Supl. 13: Efectos de la naloxona sobre el comportamiento sexual de ratas macho Wistar SERT^{+/-}. N = 12/grupo.

Dosis de Naloxona, mg/kg	0 mg/kg A	5 mg/kg B	10 mg/kg C	20 mg/kg	ANOVA de medidas repetidas (significancia)
Parámetros medidos	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	
# E	2.6±0.3	2.3±0.4	2.6±0.3	2.8±0.3	F(3,11)= 0.41; P=0.7430
Latencia 1ª M (s)	14.9±2.5	88.8±75.1	28.1±8.4	165.7±148.6	F(3,11)= 0.67; P=0.5759
Latencia 1ª I (s)	51.5±20.9	116.8±90.6	32.8±8.9	187.8±147.0	F(3,11)= 0.68; P=0.5672
# M 1ª serie	14.3±3.7	7.3±1.1	10.1±4.1	6.2±1.3	F(3,11)= 1.54; P=0.2226
# I 1ª serie	6.5±0.7	5.6±0.6	6.6±0.8	5.0±0.9	F(3,11)= 1.16; P=0.3370
Latencia 1ª E (s)	538.3±176.3	644.8±204.6	427.3±115.6	412.1±150.9	F(3,11)= 0.50; P=0.6844
PEI	337.0±18.7	417.1±37.5	390.6±21.5	376.8±17.9	F(3,11)= 1.78; P=0.1665
CE ₁	44.2±6.8	46.0±4.7	50.3±4.8	43.5±5.8	F(3,11)= 0.34; P=0.7901

M = monta; I = intromisión; E = eyaculación; PEL = intervalo post eyaculatorio; # = número; CE = eficiencia copulatoria = [# intromisiones / (# intromisiones + # montas)] * 100. A = Significativamente (p <0.05) diferente de 0 mg/kg. B = Significativamente (p <0.05) diferente de 5 mg/kg. C = Significativamente (p <0.05) diferente de 10 mg/kg.

Tabla Supl. 14. Efectos de WAY100,635 + naloxona + tramadol en ratas macho Wistar SERT^{+/-}. N = 12/grupo.

Dosis de fármaco, mg/kg IP	0 mg/kg (salina + salina) A	20 mg/kg Tramadol + Salina B	20 mg/kg Tramadol + WAY 100635 C	20 mg/kg Tramadol + Naloxona D	20 mg/kg Tramadol + WAY 100635 + Naloxona	Test de Friedman significancia
----------------------------	--------------------------------	---------------------------------	-------------------------------------	-----------------------------------	---	--------------------------------

Parámetros medidos	Mediana (IQR)	Mediana (IQR)	Mediana (IQR)	Mediana (IQR)	Mediana (IQR)	
# E	2.5(1.4)	0.0(1.3)	0.0(1.2) A	0.0(0.9) A	0.0(0.0) A	F _(4,11) = 21.17 ; P<0.0003
Latencia 1ª M (s)	21.0(21.0)	474.0(805.0)	1714(772.8) A	139.0(840.6)	1800(0.0) A	F _(4,11) = 31.17 ; P<0.0001
Latencia 1ª I (s)	80.5(501.6)	956.0(791.5)	1800(779.2)	805.0 (827.0)	1800(0.0) A	F _(4,11) = 20.52 ; P= 0.0004
# M 1ª serie	14.0(7.6)	2.5(4.0)	0.5(5.4)	0.5(4.2)	0.0(0.0) A	F _(4,11) = 25.62 ; P<0.0001
# I 1ª serie	5.0(2.5)	3.0(2.6)	0.0(2.9)	2.5(1.7)	0.0(0.0) A	F _(4,11) = 31.63; P<0.0001
Latencia 1ª E (s)	421.0(639.8)	1800(785.7)	1800(699.8)	1800(631.9)	1800(0.0) A	F _(4,11) = 21.19 ; P=0.0003
PEI	373.0(73.2)	467.0(45.8)	465.0(120.3)	468.5(48.7)	-----	F _(3,11) = 4.492 ; P= 0.2130
CE _i	35.0(16.3)	27.5(26.0)	0.0(27.0)	27.0(36.7)	0.0(0.0) A	F _(4,11) = 15.28; P<0.0042

Capítulo 6

Estudios farmacológicos sobre el papel de los receptores 5-HT_{1A} en el comportamiento sexual masculino de ratas normales y noqueadas del transportador de serotonina.

Esquivel-Franco, D.C.^{1,2,3}, De Boer, S.F.¹, Waldinger, M.D.⁶, Olivier, B.^{1,4,5} and Olivier, J.D.A.¹

¹Groningen Institute for Evolutionary Life Sciences (GELIFES), University of Groningen, Groningen, the Netherlands

²Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.

³Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB). Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.

⁴Dept. of Psychopharmacology, Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences, Science Faculty, Utrecht University, Utrecht, the Netherlands

⁵Department of Psychiatry, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA

⁶Dept. of Pharmacology & Physiology, College of Medicine, Drexel University, Philadelphia, PA, USA

Frontiers in Behavioral Neuroscience

Resumen

La neurotransmisión cerebral de serotonina (5-HT) desempeña un papel importante en el comportamiento sexual masculino y está bien establecido que, en ratas, la activación de los receptores 5-HT_{1A} facilita el comportamiento eyaculatorio. Sin embargo, la contribución relativa de los autorreceptores somatodendríticos 5-HT_{1A} y los heterorreceptores 5-HT_{1A} postsinápticos en este comportamiento pro sexual no está clara. El objetivo de este trabajo es determinar el papel de los autorreceptores presinápticos versus los heterorreceptores postsinápticos en los efectos pro sexuales de la activación del receptor 5-HT_{1A}. Los efectos agudos de los agonistas preferenciales del receptor 5-HT_{1A}: F-13714 (0.0025-0.16 mg/kg, IP), un agonista preferencial del autorreceptor 5-HT_{1A} o F-15599 (0.01-0.64 mg/kg, IP), un agonista preferencial del heterorreceptor 5-HT_{1A}, y S15535 (0-4 mg/kg, IP) un agonista mixto del autorreceptor 5-HT_{1A} y antagonista del heterorreceptor, sobre el comportamiento sexual masculino en ratas macho de la cepa Wistar de tipo salvaje (wildtype, SERT^{+/+}) y en aquellas cullo transportador de serotonina ha sido eliminado (SERT^{-/-}). Estos últimos animales, que exhiben altos niveles de 5-HT extracelulares y receptores 5-HT_{1A} desensibilizados, modelan cambios neuroquímicos subyacentes a la disfunción sexual crónica inducida por ISRS.

Nuestros resultados demuestran un efecto de genotipo claro y estable después del entrenamiento sexual, donde las ratas macho SERT^{+/+} tuvieron un comportamiento sexual a un nivel más alto que los machos SERT^{-/-}. Tanto F-15599 como F-13714 indujeron actividad pro sexual tanto en animales SERT^{+/+} como SERT^{-/-}. En comparación con las ratas SERT^{+/+}, la curva dosis-respuesta de F13714 en las ratas SERT^{-/-} se desplazó hacia la derecha. Las ratas SERT^{+/+} y SERT^{-/-} respondieron de manera similar a F15599. En ambos genotipos, la potencia del F-13714 fue mucho más fuerte en comparación con F-15599. S15535 no tuvo ningún efecto sobre el comportamiento sexual en ninguno de los genotipos.

En conclusión, los dos compuestos con efectos diferenciales sobre los autorreceptores y heterorreceptores 5-HT_{1A}, ejercieron actividad pro sexual en ratas SERT^{+/+} y SERT^{-/-}. Esto hace que las interpretaciones de si los receptores 5-HT_{1A} pre o postsinápticos están involucrados en la actividad pro sexual sean bastante difíciles. Además, la inactividad de S15535 en el comportamiento sexual en cualquiera de los genotipos fue inesperada. La pregunta sigue siendo si el perfil de actividad in vivo de los diversos ligandos del receptor 5-HT_{1A} utilizados es suficiente para diferenciar las posibles contribuciones de los receptores 5-HT_{1A} pre y/o postsináptico en el comportamiento sexual de ratas macho.

Palabras clave: serotonina, comportamiento sexual masculino, rata, receptor 5-HT_{1A}, transportador de serotonina, autorreceptores 5-HT_{1A}, heterorreceptores 5-HT_{1A}.

1. Introducción

El sistema serotoninérgico desempeña un importante papel modulador en el comportamiento sexual (Uphouse & Guptarak, 2010). Esto se ilustra, por ejemplo, con los efectos del tratamiento crónico de ISRS en pacientes deprimidos que produce un incremento en los niveles de 5-HT que a menudo causan disfunciones sexuales, como en el caso de los hombres, eyaculación tardía y problemas de libido (Segraves & Balon, 2014). Los primeros estudios en ratas macho identificaron agonistas del receptor 5-HT_{1A} (R) como 8-OH-DPAT, las azapironas (por ejemplo, buspirona, ipsapirona y gepirona) y otras (por ejemplo, flesinoxano) como fármacos pro sexuales (Ahlenius et al., 1981; Ahlenius & Larsson, 1985; revisado en: Snoeren et al., 2014). El agonista prototípico 5-HT_{1A} R (+/-) y (+) - 8-OH-DPAT, estimula de manera potente el comportamiento sexual de la rata macho; en un cierto período de tiempo (por ejemplo, 30 min), el número de eyaculaciones aumenta en asociación con el acortamiento en las latencias de eyaculación y la necesidad de un menor número de intromisiones para eyacular (Chan et al., 2011; Hillegaart & Ahlenius, 1998; Uphouse & Guptarak, 2010).

Los receptores 5-HT_{1A} se encuentran presentes como autorreceptores inhibidores presinápticos en el soma y las dendritas de las neuronas serotoninérgicas del núcleo de Raphé que se proyectan en muchas áreas del prosencéfalo (Altieri et al., 2013; Fernandez-Guasti et al., 1992; Le Poul et al., 1995; Marek, 2010). Además, los receptores 5-HT_{1A} también están presentes como heteroreceptores postsinápticos en diversas áreas del cerebro, principalmente en el cerebro anterior (Frink et al., 1996; Garcia-Garcia et al., 2017). La administración sistémica aguda de agonistas no selectivos de 5-HT_{1A} R (activación de receptores pre y postsinápticos) conduce a una disminución de la liberación serotoninérgica, pero al mismo tiempo a la activación de heteroreceptores postsinápticos de 5-HT_{1A} (Lladó-Pelfort et al., 2012; Müller et al., 2007). El resultado conductual

resultante (facilitación del comportamiento sexual masculino) es bastante difícil de explicar por este complejo mecanismo que subyace a la activación de todos los receptores 5-HT_{1A}.

Para explorar más a fondo el papel de los receptores 5-HT_{1A} pre y postsinápticos en el comportamiento sexual masculino, los agonistas 5-HT_{1A}R selectivos y de alta afinidad desarrollados más recientemente son sumamente útiles. Estos denominados agonistas preferenciales o funcionalmente selectivos (Garcia-Garcia et al., 2014; Adrian Newman-Tancredi, 2011) para receptores 5-HT_{1A} pre o postsinápticos. F15599 es un agonista selectivo de 5-HT_{1A} R de alta afinidad (K_i = 3.4 nM) para los heteroreceptores postsinápticos de 5-HT_{1A}, mientras que F13714 (K_i = 0.1nM) es un agonista de autorreceptor preferencial de 5-HT_{1A} (Sietse F. de Boer & Newman-Tancredi, 2016; Hazari et al., 2017; Koek et al., 2001). Nuestro grupo estudio ambos compuestos en un estudio de dosis-respuesta en el comportamiento sexual de ratas macho. Otro ligando 5-HT_{1A} R de alta afinidad (K_i = 1.8 nM), S-15535 actúa in vivo como un agonista preferencial en los autorreceptores presinápticos y como antagonista en los heterorreceptores 5-HT_{1A} postsinápticos (Carli et al., 1999; Millan et al., 1993). Este compuesto es una herramienta interesante para estudiar en el comportamiento sexual masculino, ya que puede arrojar más luz sobre el papel complejo de los receptores 5-HT_{1A} en el comportamiento sexual de la rata macho.

Las ratas macho que carecen del transportador de serotonina (SERT^{-/-}) consisten en un genotipo robusto que tiene un rendimiento eyaculatorio basal más bajo que las ratas de tipo salvaje (SERT^{+/+}) o las ratas noqueadas heterocigoto del transportador de serotonina (SERT^{+/-}; Chan et al., 2011; Esquivel-Franco et al., 2018). Este modelo animal también se ha propuesto y utilizado como modelo animal para el estudio de la de disfunción sexual inducida por el uso crónico de ISRS, que se cree que es causada por la combinación de niveles altos de 5-HT y disminución del funcionamiento del receptor 5-HT_{1A} similar a la que induce el tratamiento crónico con ISRS en

animales normales (Chan et al., 2011). En particular, este fenómeno de desensibilización de los receptores 5-HT_{1A} es muy relevante en este caso para poder proporcionar aún más claridad en cuanto a la potencia de los agonistas preferenciales para estimular el comportamiento sexual. Las ratas SERT^{-/-} tienen niveles de serotonina extracelular más altos que los animales SERT^{+/+}, lo cual es comparable a la administración crónica de ISRS (Homberg et al., 2007). Los experimentos farmacológicos en estas ratas indicaron que las ratas que carecen de SERT tienen sensibilizada la reactividad del receptor 5-HT_{1A}; este funcionamiento sensibilizado del receptor 5-HT_{1A} probablemente no sea un fenómeno global, pero podría estar limitado a algunas subpoblaciones específicas de receptores 5-HT_{1A}, como lo indican la expresión modificada de las respuestas autónomas como la temperatura corporal central en animales SERT^{+/+} y SERT^{-/-} (Homberg et al., 2008; Olivier et al., 2008), los experimentos realizados en el comportamiento sexual masculino (Chan et al. 2011) también indicaron que al menos dos poblaciones de receptores 5-HT_{1A} están involucrados en su expresión. Para el comportamiento sexual normal, se necesita la activación de una población de receptores 5-HT_{1A} y este grupo se desensibiliza en ratas SERT^{-/-}. Los efectos pro sexuales de 8-OH-DPAT están mediados por receptores 5-HT_{1A}, que son menos sensibles en ratas SERT^{-/-}. Esta diferencia hace que la rata SERT^{-/-} sea un modelo más atractivo para probar los diferentes fármacos moduladores del receptor 5-HT^{1A}: F15599, F13714 y S-15355. Finalmente, seleccionamos ratas macho que, después de un entrenamiento extenso (Pattij et al., 2005), muestran un bajo nivel de comportamiento sexual, es decir, eyaculaciones. Debido a que los agonistas del receptor 5-HT_{1A} facilitan la eyaculación, un nivel inicial demasiado alto de eyaculaciones probablemente interactuaría con los efectos pro sexuales de estos fármacos. Para identificar el papel de los receptores somatodendríticos (auto) y los receptores post (hetero), utilizamos F13714, F15599 y S15535 en ratas SERT^{+/+} y SERT^{-/-}.

2. Materiales y métodos

2.1 Animales

Las ratas de la cepa Wistar se criaron en nuestras instalaciones para animales (Universidad de Groningen, GELIFES) utilizando machos y hembras heterocigotos transportadores de serotonina (SERT), lo que resultó en animales SERT macho y hembra de tipo salvaje (SERT^{+/+}), heterocigoto (SERT^{+/-}) y homocigoto o noqueadas (SERT^{-/-}). Utilizamos dos lotes de animales, el primero compuesto por sesenta y tres ratas macho SERT (SERT^{+/+}, n = 32) y (SERT^{-/-}, n = 31) y el segundo de treinta y dos ratas macho (n = 16 machos SERT^{+/+} y n = 16 machos SERT^{-/-}), todas ellas de al menos 12 semanas de edad cuando se usan para experimentos de comportamiento sexual.

Se utilizaron ratas hembra SERT^{+/-} y SERT^{+/+} como estímulo sexual (n = 120). Las ratas se alojaron en condiciones de luz oscura invertida (luz de 12 h: oscuridad de 12 h, luces apagadas de 8:00 a.m. a 8 p.m.). Después de las pruebas de entrenamiento de 6 semanas (30 min/prueba), las ratas macho fueron consideradas sexualmente entrenadas y clasificadas según las frecuencias de eyaculación que mostraron durante las últimas tres pruebas. Las ratas macho muestran, después de un entrenamiento extenso, un fenotipo sexual bastante estable (Chan et al., 2008; Olivier et al., 2006; Pattij et al., 2005). En estos experimentos, para el lote uno seleccionamos ratas que mostraron un fenotipo eyaculatorio normal (entre 1 y 2 eyaculaciones por prueba después del entrenamiento, durante las últimas tres sesiones) y para las ratas del segundo lote que mostraron un fenotipo sexual bajo (entre 0 y 1 eyaculación por prueba después del entrenamiento, durante las últimas tres sesiones). Los animales fueron alojados socialmente (2-5 por jaula, máximo 4 para los machos). Las jaulas se enriquecieron con bloques de madera para roer y material de anidación (Envirodri). Se entrenó sexualmente a un total de noventa y cinco machos (lote uno y dos) durante 6 semanas y se seleccionó un total de 45 ratas macho (lote uno + lote dos) con un número promedio y bajo

de eyaculaciones, respectivamente (esto incrementa la sensibilidad de la mejora esperada en el comportamiento sexual por los agonistas preferenciales para el receptor 5-HT_{1A} y para igualar el grupo control tanto como sea posible con los animales noqueados). Todos los experimentos duraron 13 semanas en total (después del entrenamiento). En todos los experimentos individuales del lote uno se utilizaron 12 ratas por genotipo (SERT^{+/+} y SERT^{-/-}), y para el lote dos usamos 10 ratas SERT^{+/+} y 11 SERT^{-/-}; los animales se usaron solo una vez a la semana para garantizar suficiente tiempo de lavado de los fármacos. Las ratas tuvieron acceso *ad libitum* a comida y agua. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices gubernamentales para el cuidado y uso de animales de laboratorio (Centrale Commissie Dierproeven) y fueron aprobados por el Comité Ético para la Investigación Animal del Groningen Institute for Evolution and Life Sciences (GELIFES) de la Universidad de Groningen. Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar la cantidad de animales y su sufrimiento.

2.2 Ratas hembra

Las ratas hembra fueron ligadas en ambas trompas para prevenir gestación. Para realizar la cirugía de ligadura de trompas, se anestesió a las hembras (isoflurano) y se les dio analgésicos (fynadina, 0.1 mg / 100 g) antes de la cirugía, y a las 24 y 48 horas post-operación. Las hembras tenían al menos 12 semanas de edad cuando se realizó la cirugía, y se les dio dos semanas de recuperación antes de que se les indujera receptividad sexual mediante la administración de benzoato de estradiol (50 µg en 0.1 ml de aceite, SC, 36-48 horas antes de la prueba) para las pruebas de entrenamiento y experimentos de comportamiento sexual. Las hembras se usaron no más de una vez cada dos semanas y no más de 2 veces por día experimental.

2.3 Tratamiento farmacológico y experimentos conductuales

Para el primer lote, los animales recibieron todas las dosis de F13714 y F15599 en un diseño aleatorio cruzado para evitar efectos de orden; después de este experimento, S15535 se administró en un diseño aleatorio. Para el segundo lote, a los animales solo se les administró S15535 en un diseño aleatorio como en el primer conjunto de animales. Como se describió anteriormente en Olivier et al. (2017), cuando se realizaron pruebas farmacológicas, a las ratas macho se les dio un tiempo de habituación de 30 minutos en las cajas de prueba justo después de la administración del fármaco mediante inyección IP, antes de que se introdujera a la rata hembra. Todo el comportamiento durante la prueba de 30 minutos se grabó en video después de la introducción de la hembra y también se evaluó el comportamiento en vivo, y se registraron los siguientes parámetros de la serie de eyaculación (Chan et al., 2011): número de eyaculaciones / prueba (E), número de montas (M), número de intromisiones (I), latencia (s) a la primera monta (LM), latencia (s) a la primera intromisión (LI) y latencia (s) a la primera eyaculación (LE). Después de la eyaculación, se calculó la latencia posterior a la eyaculación (PEL), utilizando el tiempo desde la primera eyaculación y el tiempo de la primera monta / intromisión (lo que ocurriera primero) de la segunda serie de eyaculación. La relación de intromisión (IR) se calculó como: $IR = (\# I / (\# I + \# M)) * 100\%$. EL se calculó utilizando el tiempo del LE de la primera serie de eyaculación menos la latencia de intromisión de la primera serie de eyaculación ($EL = LE - LI$). Estos parámetros se utilizaron para ejecutar el análisis estadístico.

Debido a que es importante tener una farmacodinámica y una cinética comparables en los estudios farmacológicos, se ha elegido una prueba de duración fija; 30 minutos (1800 segundos). En los casos en que el tratamiento farmacológico no tuvo "efecto" sobre la eyaculación y el comportamiento sexual, o pocos animales realizaran una primera eyaculación, no fue posible

realizar análisis estadísticos y, por lo tanto, para esos casos, asignamos valores de 1800 segundos (es decir, la duración máxima de la prueba) para algunas latencias (latencia de eyaculación, monta e intromisión), aunque esto es indudablemente un tema de discusión como hemos mencionado antes (Chan et al., 2011; Olivier et al., 2017). Todas las tablas y figuras muestran los resultados de la primera serie de eyaculación.

2.4 Fármacos

F15599 y F13714 (Pierre Fabre Pharmaceuticals, Francia; Lote # SBR1401003 y # JLM3001201, resp.), y S-15535 (Servier Pharmaceuticals, Francia; Lote B01JLP061A) se disolvieron en NaCl 0.9% (solución salina) y cada solución se preparó fresca en cada día de prueba. Todos los fármacos se administraron mediante inyección intraperitoneal (IP) 30 minutos antes de la prueba.

2.5 Entrenamiento

Para el primer lote, las ratas macho SERT^{+/+} (N = 32) y SERT^{-/-} (N = 31) fueron entrenadas sexualmente 6 veces (30 min, una vez a la semana); y para el segundo lote SERT^{+/+} (N = 16) y SERT^{-/-} (N = 16) las ratas macho fueron entrenadas sexualmente 10 veces (30 minutos, una vez a la semana, recibieron entrenamiento adicional debido al rendimiento sexual extremadamente bajo) para evaluar y estabilizar su actividad sexual basal. Las ratas tuvieron un período de habituación de 10 minutos en la caja de prueba justo antes de la sesión de entrenamiento. Al final del período de habituación, se introdujo una hembra receptiva en la caja y se evaluó el comportamiento sexual durante 30 minutos. Las hembras no receptivas se cambiaron por otra hembra receptiva. La capacitación y las pruebas se realizaron en arenas rectangulares de madera (57 cm x 82 cm x 39 cm; pared de vidrio) con el piso cubierto de material de cama regular. Para estimular el comportamiento sexual, no se cambió el material de cama durante el entrenamiento y las pruebas

para preservar las feromonas de rondas anteriores y crear un ambiente sexual más competitivo. Solo los machos que mostraron niveles estables de eyaculación normal (1-2 eyaculaciones para el lote 1) y bajos (0-1 eyaculaciones para el lote 2) en las últimas tres pruebas, (24 en total para el lote 1) fueron utilizados para los experimentos farmacológicos (lote uno: N = 12 por genotipo); lote dos en total 21 (10 SERT^{+/+} y 11 SERT^{-/-} ratas). Todas las sesiones de entrenamiento y experimentos se realizaron en condiciones de luz roja entre las 10:00 a.m. y las 17:00 p.m.

2.6 Experimentos farmacológicos

Lote 1

Experimento uno: respuesta a la dosis de F15599 y F13714. Se seleccionaron 24 ratas macho eyaculadoras normales (N = 12 por genotipo SERT) y se realizó un diseño cruzado. Las ratas recibieron el vehículo (solución salina); 0.01, 0.04, 0.16 y 0.64-mg/kg F15599 y 0.0025, 0.01, 0.04 y 0.16-mg/kg F13714 vía IP. Los experimentos se realizaron una vez por semana en el mismo día de prueba, durante nueve semanas, los animales y el tratamiento se asignaron al azar durante las nueve semanas. Aunque los experimentos con estos dos fármacos se realizaron juntos, decidimos realizar el análisis estadístico por separado para cada compuesto.

Experimento dos: respuesta a la dosis de S15535. Los mismos 24 animales del experimento uno, recibieron vehículo (solución salina), 0.25, 1 y 4 mg/kg S15535, vía IP en un diseño aleatorio. Las pruebas se realizaron durante cuatro semanas y siempre el mismo día por semana.

Lote 2

Experimento dos: respuesta a la dosis de S15535. Se seleccionaron 10 ratas SERT^{+/+} y 11 SERT^{-/-} para un bajo número de eyaculaciones. Las ratas recibieron vehículo (solución salina), 0.25, 1 y 4

mg/kg S15535, vía IP en un diseño aleatorio. Las pruebas se realizaron durante cuatro semanas y siempre el mismo día por semana.

2.7 Análisis estadísticos

Las diferencias en las frecuencias basales de eyaculación durante el entrenamiento entre los genotipos se analizaron utilizando un ANOVA de dos vías de medidas repetidas, con el genotipo como factor inter-sujetos y el tiempo (semanas) como factores intra-sujetos. En su caso, se realizó una prueba T de independencia. Para los experimentos de dosis-respuesta F19955, F13714 y S15535, se realizó un ANOVA de dos vías medidas repetidas con dosis como factor intra-sujeto (5 niveles) y genotipo como factor inter-sujetos (2 niveles). En su caso, se realizó un ANOVA de una vía con prueba *post-hoc* LSD. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el Paquete Estadístico de Ciencias Sociales para Windows versión 25 (SPSS, tecnologías LEAD, Chicago, EE. UU.). El nivel de significancia se estableció en $p < 0.05$.

3. Resultados

3.1 Estabilidad sexual Se registró el rendimiento sexual de los grupos de animales experimentales seleccionados que exhibieron una frecuencia de eyaculación normal (1-2 eyaculaciones) y baja (eyaculación 0-1) durante los 6 días de entrenamiento y de las 63 ratas macho entrenadas sexualmente desde el lote uno y 32 del segundo lote, solo 24 y 21 animales (respectivamente) que mostraron un rendimiento sexual y eyaculaciones normales y bajas respectivamente fueron seleccionados para realizar los estudios farmacológicos. Para el primer lote, hubo un efecto significativo de semana (tiempo) $F_{(7,154)} = 13.86$, $p < 0.001$, un efecto significativo de semana * genotipo $F_{(7,154)} = 3.40$, $p < 0.01$ y un efecto de genotipo significativo ($F_{(1, 22)} = 23.81$, $p < 0.001$). En las ratas SERT^{+/+} a partir de la semana tres en adelante, realizaron significativamente más eyaculaciones ($p < 0.05$) en comparación con las dos primeras semanas (figura 1 y tabla 1). En las

ratas $SERT^{-/-}$ solo la semana 16-20 difirió significativamente ($p < 0.05$) de todas las otras semanas (figura 1, tabla 1). Las ratas $SERT^{-/-}$ eyacularon significativamente menos en comparación con las ratas $SERT^{+/+}$ en las semanas 3-14 ($p < 0.05$), semana 16-20 ($p < 0.01$).

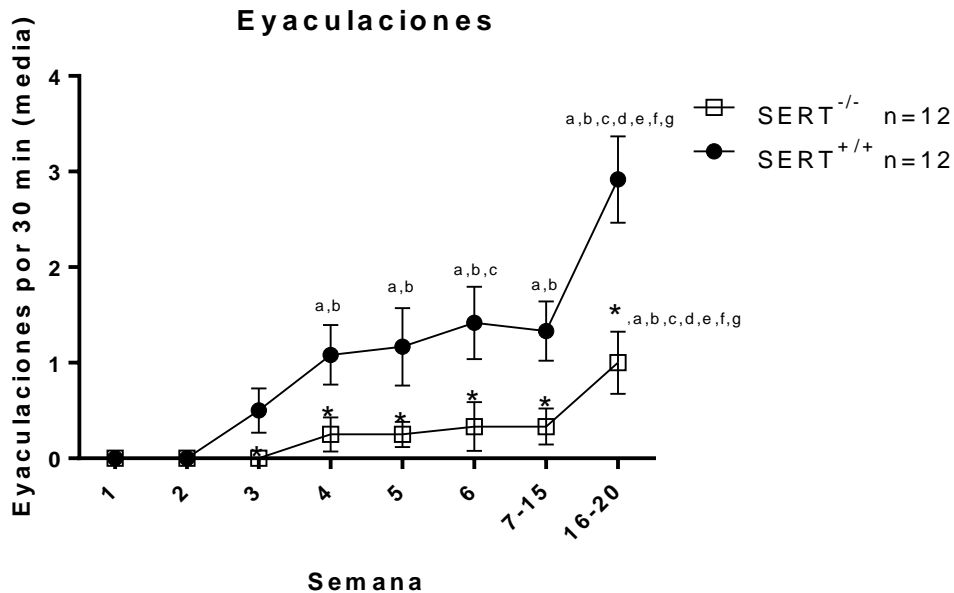


Figura 1. Frecuencias medias de eyaculación (\pm SEM) durante 6 semanas de entrenamiento de ratas macho Wistar del lote uno. También se agregan la media \pm SEM de los datos de administración de vehículo del experimento uno (F13714 y F15599) y dos (S15535) del lote uno. a: \neq de semana 1; b \neq de semana 2; c: \neq de semana 3; d: \neq de semana 4; e: \neq de semana 5; f: \neq de semana 6; g: \neq de semana 7-15; $p < 0.05$. * significativamente diferente ($p < 0.05$) de $SERT^{+/+}$. Se proporcionan análisis estadísticos detallados en la tabla 1.

Para el segundo lote de animales entrenados, hubo una diferencia significativa en las semanas de entrenamiento ($F_{(10,190)} = 3.32$, $p < 0.001$). En la semana 11-14, las ratas $SERT^{+/+}$ y $SERT^{-/-}$ tuvieron más eyaculaciones estadísticamente significativas en comparación con todas las otras semanas (todos los valores de $p < 0.01$). No se encontraron diferencias significativas en el tiempo x genotipo, y los efectos del genotipo se encontraron durante las semanas de entrenamiento (Figura 2, Tabla 2).

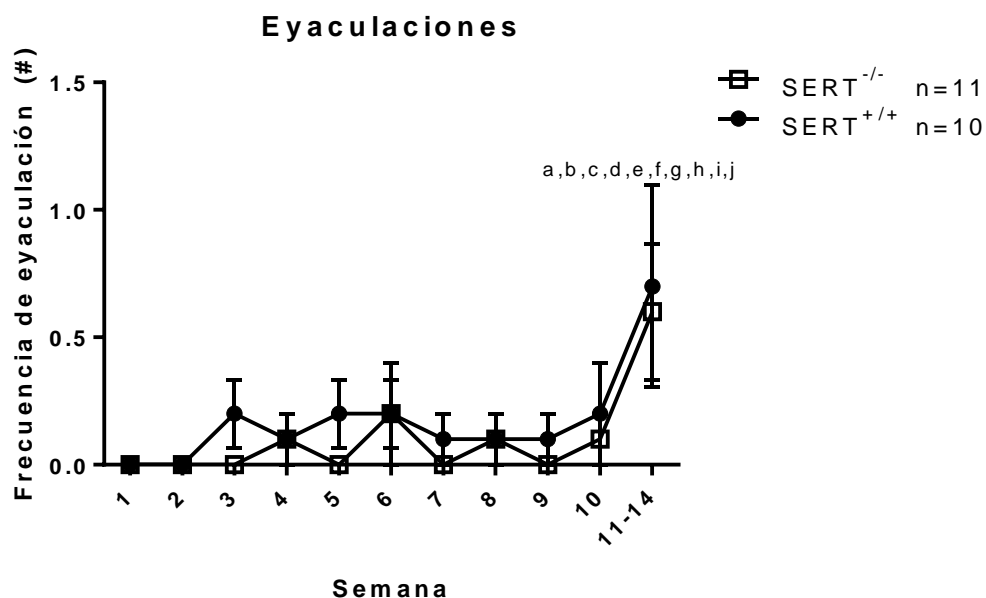


Figura 2. Frecuencias medias de eyaculación (\pm SEM) durante 10 semanas de entrenamiento de ratas macho Wistar del lote dos. También se agrega la media \pm SEM de los datos del grupo tratado con solución salina. a: \neq de semana 1; b \neq de semana 2; c: \neq de semana 3; d: \neq de semana 4; e: \neq de semana 5; f: \neq de semana 6; g: \neq de semana 7-15; p <0.05. * significativamente diferente (p <0.05) de SERT + / +. Se proporcionan análisis estadísticos detallados en la tabla 2.

Incluimos en la figura 1 los datos con solución salina reunidos en los experimentos farmacológicos realizados en el lote uno. Los datos de solución salina obtenidos para todos los animales en las semanas 7-15 fueron comparables con los últimos datos de entrenamiento, pero los datos con la administración de solución salina del último experimento (S15535) (durante la semana 16-20) mostraron valores significativamente más altos. Este nivel básico de comportamiento sexual nos hizo decidir (debido a los posibles efectos máximos) repetir el experimento S15535 en ratas con niveles muy bajos de actividad de eyaculación sexual (lote dos, datos mostrados en la tabla 2). En la figura 2 también incluimos los datos de solución salina reunidos en el experimento de dosis-respuesta S15535 del lote 2 (semana 11-14). Nuevamente, se encontró un nivel basal mejorado de

comportamiento sexual en los animales tratados con solución salina durante las semanas de tratamiento con S-155355.

3.2 Respuesta a la dosis de F15599 (Figura 3 y tabla 3)

En el experimento de dosis-respuesta, se encontró un efecto significativo de dosis ($F_{(4,88)} = 8,75$; $p < 0,001$) y genotipo ($F_{(1,22)} = 22,278$; $p < 0,001$), pero no en las interacciones de eyaculaciones. Se encontraron significados similares para las latencias de eyaculación y las relaciones de intromisión (consulte la tabla 3 para obtener estadísticas de todos los parámetros de comportamiento). Un análisis posterior reveló que las dosis más bajas e intermedias de F15599 (0.01, 0.04 y 0.16 mg/kg) no tuvieron efectos significativos sobre el comportamiento sexual en ninguno de los genotipos (figura 3, tabla 3), en comparación con la administración de solución salina ($p < 0.001$), 0.01 ($p < 0.01$) y 0.04-mg/kg ($p < 0.001$). La dosis más alta de F-15599 (0.64 mg/kg) aumentó significativamente la frecuencia de eyaculación. Además, las latencias de eyaculación fueron significativamente más cortas en 0.64 mg/kg de F15599 en comparación con solución salina ($p < 0.01$), 0.01 mg/kg ($p < 0.05$) y 0.04 mg/kg ($p < 0.01$) de F15599 (figura 3, tabla 3) en animales SERT^{+/+} y SERT^{-/-}; la dosis de 0.64 mg/kg de F15599 también aumentó significativamente la eficiencia de los animales para eyacular (IR; $p < 0.05$; figura 3, tabla 3) en comparación con la solución salina ($p < 0.01$), 0.01 mg/kg ($p < 0.05$) y 0.04 mg/kg ($p < 0.05$) de F15599.

Se encontró una disminución significativa en el número de eyaculaciones de ratas SERT^{-/-} en comparación con las ratas SERT^{+/+} en el tratamiento con solución salina ($p < 0.05$), y en 0.01 mg/kg ($p < 0.05$), 0.04 mg/kg ($p < 0,05$), 0.16 mg/kg ($p < 0,05$) y 0.64 mg/kg ($p < 0.05$) de F15599. Del mismo modo, se encontró un aumento en la latencia de la eyaculación para las ratas SERT^{-/-} en comparación con las ratas SERT^{+/+} en el tratamiento con solución salina ($p < 0.001$), y en 0.01

mg/kg ($p < 0.01$), 0.04 mg/kg ($p < 0.001$), 0.16 mg/kg ($p < 0.05$) y 0.64 mg/kg ($p < 0.001$) de F15599. Para la relación o índice de intromisión, se encontró una disminución significativa para las ratas $SERT^{-/-}$ en comparación con las ratas $SERT^{+/+}$ en el tratamiento con solución salina ($p < 0.05$), y en 0.01 mg/kg ($p < 0.01$), 0.04 mg/kg ($p < 0.05$), y 0.16 mg/kg ($p < 0.05$) de F15599.

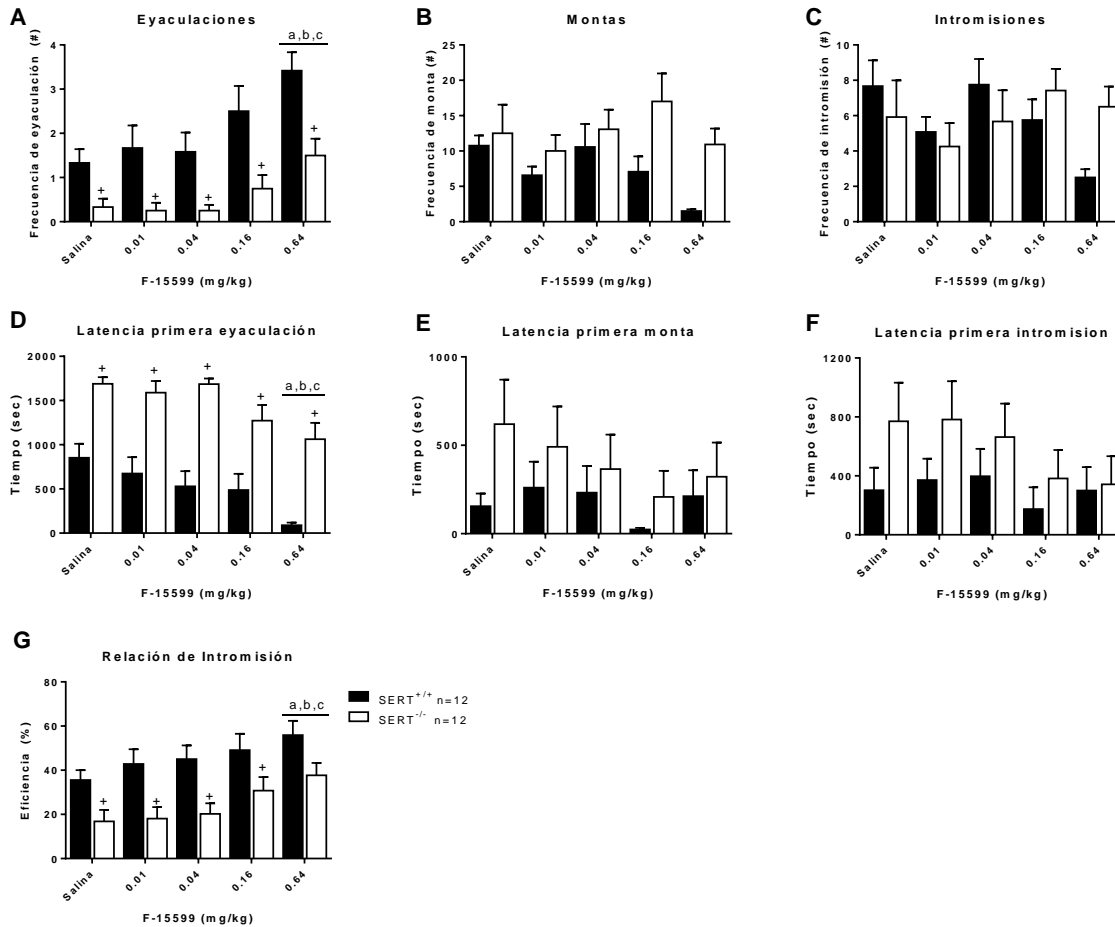


Figura 3. Comportamiento sexual de ratas macho tratadas con 0.01, 0.04, 0.16 ó 0.64 mg/kg, IP de F-15599. Se muestran el número y la latencia de las eyaculaciones por 30 min (A, D), el número y la latencia de las montas (B, E), el número y la latencia de las intromisiones (C, F) y la Relación de Intromisión (G) de la primera Serie de Eyaculación. Se proporcionan análisis estadísticos detallados en la Tabla 3. a: diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación con el grupo de solución salina, b: diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación con el grupo de 0.01mg/kg, c: diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación a 0.04 mg/kg grupo. +: diferencia significativa entre $SERT^{+/+}$ y $SERT^{-/-}$ ($p < 0.05$).

3.3 Respuesta a la dosis de F13714 (Figura 4; tabla 4)

En general, F13714 indujo efectos pro sexuales en ambos genotipos, aunque las curvas de dosis-efecto para ambos genotipos diferían considerablemente (figura 4, tabla 4). Teniendo en cuenta las eyaculaciones, hubo diferencias significativas en las dosis ($F_{(4,88)} = 3.287$, $p < 0.05$), genotipo ($F_{(1,22)} = 20.649$, $p < 0.001$) e interacción genotipo x dosis ($F_{(4,88)} = 4.810$, $p < 0.01$). Se encontraron significancias similares para las latencias de eyaculación (ver tabla 4 para estadísticas de todos los parámetros de comportamiento). En ratas SERT^{+/+}, F13714 estimuló el comportamiento sexual significativamente, como se ilustra (en comparación con la solución salina) en el aumento de la frecuencia de eyaculación a 0.0025 mg/kg ($p < 0.01$), 0.01 mg/kg ($p = 0.06$) y 0.04 mg/kg ($p < 0.05$) mg/kg de F13714. En las ratas SERT^{-/-}, los efectos pro sexuales se observaron solo a la dosis más alta (0.16mg/kg) versus solución salina ($p < 0.05$) y 0.025 mg/kg ($p < 0.05$) de F13714. El número de montas disminuyó igualmente en las ratas SERT^{+/+} y SERT^{-/-} a 0.16 mg/kg de F13714 en comparación con solución salina ($p < 0.01$), 0.025 mg/kg ($p < 0.01$), 0.01 mg/kg ($p < 0.001$) y 0.04 mg/kg ($p < 0.05$) de F13714. En SERT^{+/+}, pero no en animales SERT^{-/-}, la latencia de intromisión aumentó a la dosis más alta ($F_{(4,55)} = 4.203$, $p < 0.01$). La latencia de intromisión a la dosis más alta (0.16 mg/kg) de F13714 fue significativamente más larga en comparación con la solución salina ($p < 0.01$), 0.0025 mg/kg ($p < 0.001$), 0.01 mg/kg ($p < 0.01$) y 0.04 mg/kg ($p < 0.05$) de F13714. Por último, el número de intromisiones disminuyó significativamente en las ratas SERT^{+/+} ($F_{(4,55)} = 8.194$; $p < 0.001$). Las intromisiones se redujeron significativamente en los animales tratados con 0.16 mg/kg de F13714 en comparación con los animales tratados con solución salina ($p < 0.001$), 0.0025 mg/kg ($p < 0.01$) y 0.01 mg/kg ($p < 0.01$) de F13714. Además, los machos SERT^{+/+} tratados con 0.04 mg/kg de F13714 tuvieron un número significativamente reducido de

intromisiones en comparación con los tratados con solución salina ($p < 0.001$), 0.0025 mg/kg ($p < 0.01$) y 0.01 mg/kg ($p < 0.05$) de F13714.

Las ratas SERT^{-/-} tuvieron frecuencias de eyaculación significativamente más bajas en comparación con las ratas SERT^{+/+} después del tratamiento con solución salina ($p < 0.05$), y después del tratamiento con 0.0025 mg/kg ($p < 0.01$), 0.01 mg/kg ($p < 0.01$), y 0.04 mg/kg ($p < 0.01$) de F13714. Para las montas, solo a una dosis de 0.04 mg/kg de F13714, las ratas SERT^{-/-} mostraron una frecuencia de monta significativamente mayor ($p < 0.01$) en comparación con las ratas SERT^{+/+}. A la misma dosis, las ratas SERT^{-/-} también mostraron una mayor frecuencia de intromisión en comparación con las ratas SERT^{+/+}. Para la latencia a la primera eyaculación, se encontró un aumento significativo para las ratas SERT^{-/-} en comparación con las ratas SERT^{+/+} para todas las dosis (todos los valores de $p < 0.01$). La latencia a la primera monta fue significativamente mayor para las ratas SERT^{-/-} en comparación con SERT^{+/+} después del tratamiento con solución salina ($p < 0.05$) y la latencia a la primera intromisión también fue significativamente mayor para las ratas SERT^{-/-} en comparación con SERT^{+/+} a 0.0025 mg/kg de F13714 ($p < 0.05$).

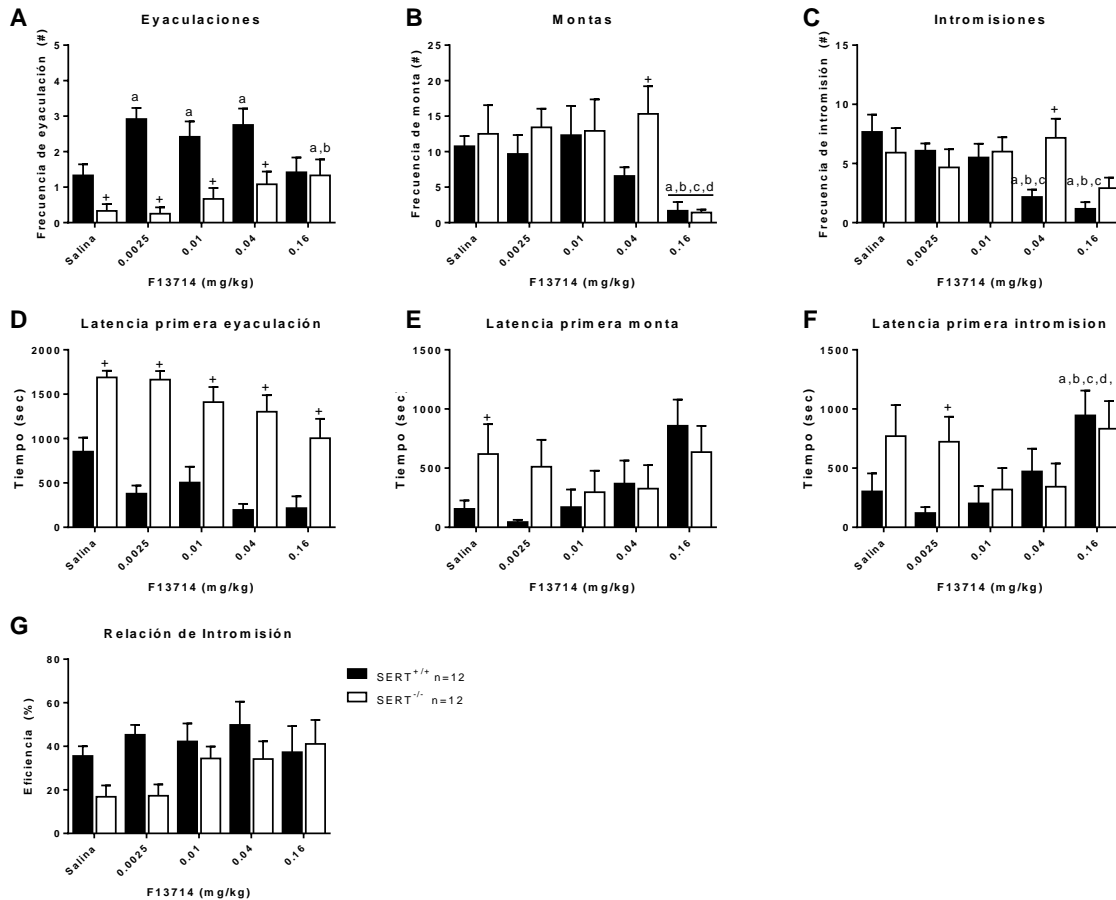


Figura 4. Comportamiento sexual de ratas macho tratadas con solución salina, 0.0025, 0.01, 0.04 o 0.16-mg/kg de F13714. Se proporciona el número y la latencia de las eyaculaciones por 30 min (A, D), el número y la latencia de las montas (B, E), el número y la latencia de las intromisiones (C, F) y la Relación de Intromisión (G) de la primera serie de eyaculación. Los análisis estadísticos detallados se muestran en la tabla 4. a: diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación con el grupo de solución salina, b: diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación con el grupo de 0.0025 mg/kg, c: diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación a 0.01 mg/kg grupo. +: diferencia significativa entre SERT^{+/+} y SERT^{-/-} ($p < 0.05$).

3.4 Respuesta a la dosis de S15535 (Figuras 5 y 6; tablas 5 y 6)

S15535 (0.25, 1 y 4 mg/kg) no tuvo efectos significativos sobre el comportamiento sexual en SERT^{+/+} y SERT^{-/-} (figuras 5 y 6) en comparación con la solución salina en cualquier lote de animales. En el primer lote de ratas, se encontró un efecto de genotipo significativo para las frecuencias de eyaculación ($F_{(1,22)} = 21.167$, $p < 0.001$; fig. 5A). Las ratas SERT^{+/+} tuvieron frecuencias de eyaculación significativamente más altas después del tratamiento con solución

salina ($p < 0.001$), 0.25mg/kg ($p < 0.001$), 1mg/kg ($p < 0.05$) y 4mg/kg ($p < 0.001$) S15535 en comparación con animales SERT^{-/-}. Se encontraron efectos similares para la latencia de la eyaculación ($F_{(1,22)} = 25.627$, $p < 0.001$; figura 5D; tabla 5) donde hubo un aumento para los animales SERT^{-/-} versus SERT^{+/+} después del tratamiento con solución salina ($p < 0.001$), y después del tratamiento con 0.25mg/kg ($p < 0.05$), 1 mg/ kg ($p < 0.05$) y 4 mg/kg ($p < 0.001$) S15535, y hasta cierto punto en la relación de intromisión, aunque esto fue solo significativo en el grupo tratado con solución salina ($p < 0.05$) y 4 mg/kg ($p < 0.05$) S155355. En el segundo lote de animales, no se encontraron diferencias significativas en la mayoría de los parámetros medidos, aunque se encontró un efecto de dosis significativo para el número de montas ($F_{(3,80)} = 2.946$, $p < 0.05$). El análisis reveló una reducción significativa en el número de montas entre solución salina y 4 mg/kg S-155355 ($p < 0.05$) y entre 1 mg/kg y 4 mg/kg S-155355 ($p < 0.05$). Además, se encontró un efecto de genotipo en la latencia a la primera intromisión ($F_{(1,19)} = 6.499$, $p < 0.05$). En comparación con SERT^{+/+}, SERT^{-/-} mostró una latencia más corta a la primera intromisión ($p < 0.05$; consulte la figura 6 y la tabla 6).

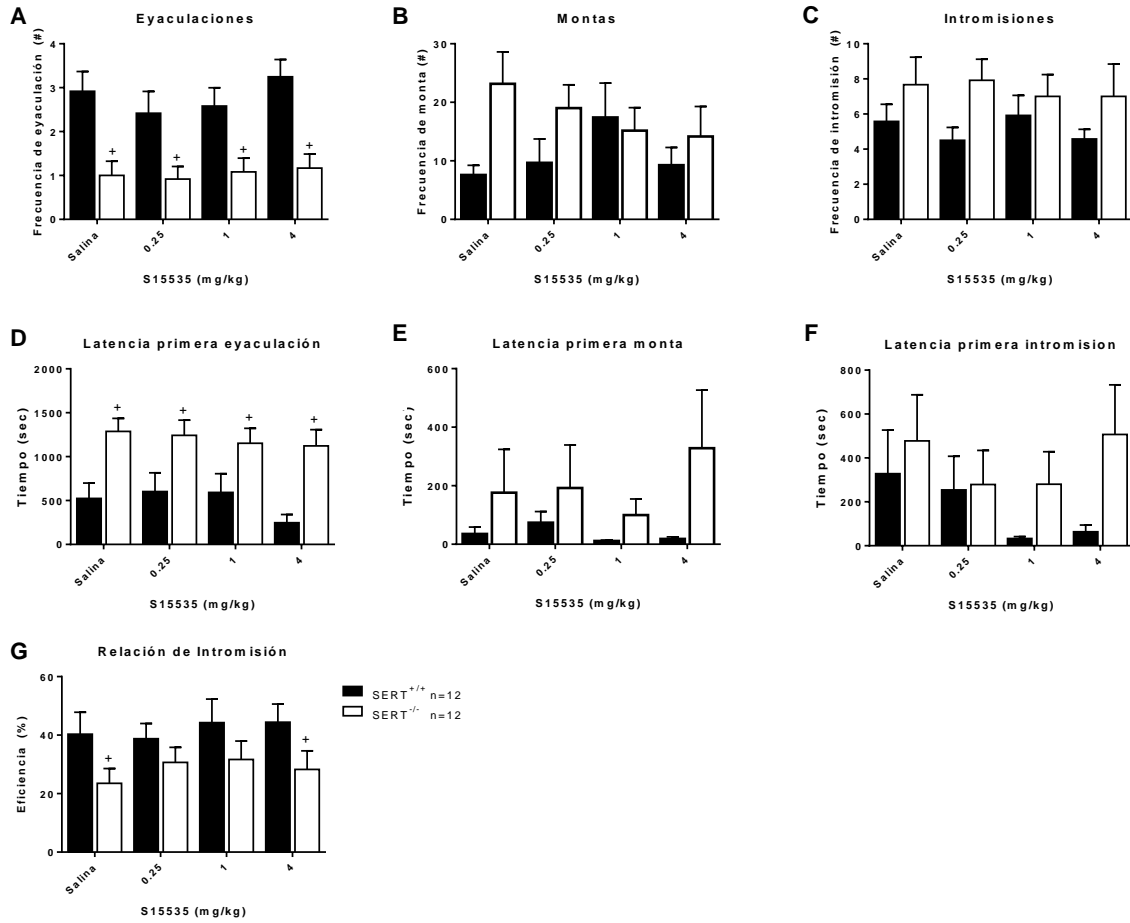


Figura 5. Comportamiento sexual de ratas macho del lote uno tratado con solución salina, 0.25, 1 o 4-mg/kg de S15535. El número y la latencia de las eyaculaciones por 30 min (A, D), el número y la latencia de las montas (B, E), el número y la latencia de las intromisiones (C, F), el intervalo post eyaculatorio (G) y la relación de intromisión (H) de la primera serie de eyaculación se proporcionan. Los análisis estadísticos detallados se muestran en la tabla 5. +: diferencia significativa entre los grupos SERT^{+/+} y SERT^{-/-}.

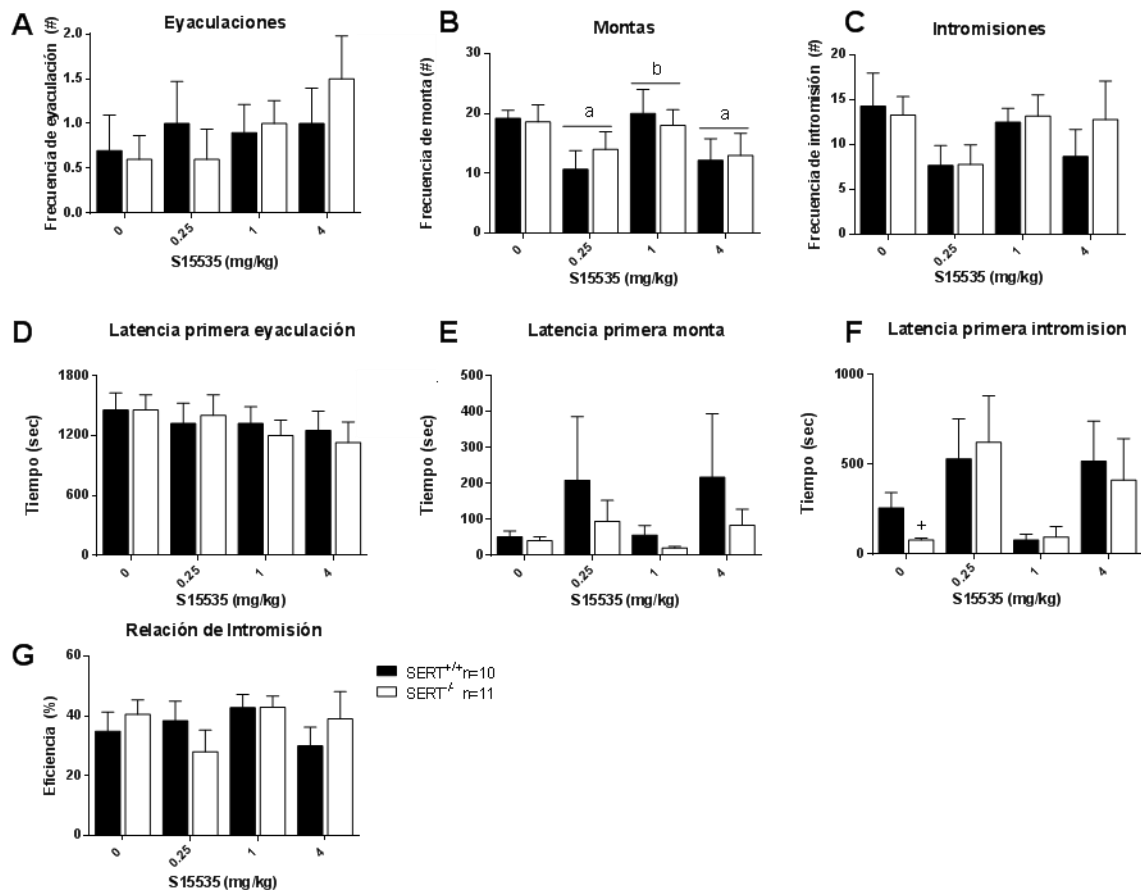


Figura 6. Comportamiento sexual de ratas macho del lote dos tratados con solución salina, 0.25, 1 o 4-mg/kg de S15535. Se proporciona el número y la latencia de las eyaculaciones por 30 min (A, D), el número y la latencia de las montas (B, E), el número y la latencia de las intromisiones (C, F) y la relación de intromisión (G) de la primera serie de eyaculación. Los análisis estadísticos detallados se muestran en la tabla 6. a: diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación con el grupo de solución salina, c: diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación con el grupo 1 mg/kg. +: diferencia significativa entre SERT^{+/+} y SERT^{-/-} ($p < 0.05$).

3.5 Comparación entre F15599 y F13714 (figura suplementaria 1)

Se realizó un diagrama de curva de ajuste para las ratas SERT^{+/+} y SERT^{-/-} en una escala logarítmica (ver figura suplementaria 1) donde los datos se normalizaron frente al grupo tratado con solución salina. El ED₅₀ se calculó para SERT^{+/+} (F15599, ED₅₀ = 0.21; F13714, ED₅₀ = 0.0065) y SERT^{-/-} (F15599, ED₅₀ = 0.165; F13714, ED₅₀ = 0.00178) y mostró que F13714 era más potente en comparación con F15599 en ratas SERT^{+/+} y SERT^{-/-}. El diagrama de ajuste curvo

también mostró que las ratas SERT^{-/-} eran sensibles a ambos compuestos, ya que podían aumentar el porcentaje de eyaculaciones en comparación con el grupo tratado con solución salina.

4. Discusión

En el presente estudio, después de un entrenamiento extenso de los dos genotipos estudiados (SERT^{+/+} y SERT^{-/-}), los animales mostraron dos fenotipos sexuales diferentes pero estables, confirmando hallazgos anteriores (Chan et al., 2011) donde ratas macho SERT^{+/+} realizaron comportamiento sexual a un nivel más alto que ratas SERT^{-/-}. Los cambios permanentes en los procesos serotoninérgicos en el sistema nervioso central al eliminar la proteína SERT desde la concepción (Chan et al., 2011; Olivier et al., 2011), aparentemente conducen a cambios permanentes en el comportamiento sexual masculino en ratas. El paradigma de comportamiento sexual de ratas macho utilizado en los presentes estudios se ha desarrollado en las últimas décadas (Chan et al., 2008; Olivier et al., 2011; Pattij et al., 2005), específicamente para evaluar los efectos de los fármacos psicoactivos, incluidos los antidepresivos (Chan et al., 2010; Heijkoop et al., 2018; Marcel D Waldinger & Olivier, 2004). El paradigma es capaz de distinguir los efectos agudos de fármacos como los efectos pro sexuales del agonista al receptor 5-HT_{1A} (Pattij et al., 2005), pero también los efectos inhibidores crónicos de los antidepresivos ISRS (Bijlsma et al., 2014; Chan et al., 2011, 2010). Los efectos pro sexuales de los fármacos en el comportamiento sexual de las ratas macho se reflejan en la latencia de inicio de la actividad sexual hacia una hembra recién inducida en estro conductual; reflejado en un intervalo más corto para eyacular (Andersson & Larsson, 1994), que incluye un número reducido de montas e intromisiones para eyacular y un mayor número de eyaculaciones durante 30 minutos. La reducción de la conducta sexual, v.g. por administración crónica de antidepresivos (Bijlsma et al., 2014; Chan et al., 2010) tiene efectos revertidos. Este perfil crónico inducido por los ISRS (antidepresivos), de comportamiento sexual

masculino reducido es comparable al comportamiento sexual de ratas $SERT^{-/-}$ y respalda la hipótesis de que las ratas $SERT^{-/-}$ masculinas están modelando los efectos sexuales de la administración crónica de SSRI (Chan et al., 2011; Olivier et al., 2011).

Dos agonistas preferenciales del receptor $5-HT_{1A}$, el agonista preferencial de autorreceptor $5-HT_{1A}$ F13714 (Assié et al., 2006; Becker et al., 2016) y el agonista de heterorreceptor $5-HT_{1A}$ preferencial F15599 (Becker et al., 2016; A Newman-Tancredi et al., 2009) se probaron en ratas $SERT^{+/+}$ y $SERT^{-/-}$. Ambos compuestos indujeron actividad pro sexual en ratas $SERT^{+/+}$ y $SERT^{-/-}$. F13714 es considerablemente más potente que F15599 para generar los efectos pro sexuales, pero la similitud de la respuesta de ambos compuestos en el comportamiento sexual masculino sugiere que ambos compuestos comparten mecanismos de acción comparables para evocar este comportamiento. Esto puede apuntar a un efecto mediado por el autorreceptor. Desafortunadamente, las curvas de dosis-respuesta completas de este efecto pro sexual no estaban disponibles para ambos compuestos, haciendo imposibles las conclusiones definitivas. En las ratas $SERT^{-/-}$ tratadas con F13714, la curva dosis-respuesta se desplazó hacia la derecha en comparación con las ratas $SERT^{+/+}$, pero este no fue el caso en las ratas tratadas con F15599 donde las dosis de inhibición sexual fueron comparables en ambos genotipos. La estimulación del receptor $5-HT_{1A}$ por los agonistas al receptor $5-HT_{1A}$ no selectivos (con respecto a receptores pre y postsinápticos) como 8-OH-DPAT, flesinoxan, bupiriona, ipsapiriona y otros (Olivier et al., 1999) tienen efectos pro sexuales en ratas de tipo salvaje (Snoeren et al., 2014., para revisión), pero no se han realizado estudios previamente, en los que se investiguen las contribuciones específicas de los autorreceptores $5-HT_{1A}$ o los heterorreceptores $5-HT_{1A}$ (o ambos). S15535, un agonista selectivo del autorreceptor $5-HT_{1A}$ y un antagonista selectivo del heterorreceptor $5-HT_{1A}$, no tuvo ningún efecto sobre el comportamiento sexual masculino de las ratas $SERT^{+/+}$ y $SERT^{-/-}$, ni en ratas con

eyaculación normal (en promedio 1 -2 eyaculaciones/30 min, lote 1) ni ratas lentas (0-1 eyaculaciones/30 min, lote 2). Concluimos que S15535 se comporta como un ligando silencioso del receptor 5-HT_{1A} en el comportamiento sexual de ratas macho.

El agonista prototípico al receptor 5-HT_{1A} (+/-) o (+) - 8-OH-DPAT, un agonista heterorreceptor y autorreceptor no selectivo (Larsson et al., 1990), tiene efectos pro sexuales potentes y dependientes de la dosis (Chan et al., 2011; Mos et al., 1991). Este efecto pro sexual puede ser completamente antagonizado por el antagonista del receptor 5-HT_{1A} WAY100,635, un compuesto que se comporta de manera silenciosa (de Jong & Neumann, 2015). En ratas macho SERT^{-/-} (Chan et al., 2011) 8-OH-DPAT tuvo efectos pro sexuales, aunque (como el agonista preferencial F13714 en el presente estudio) la curva dosis-respuesta se desplazó hacia la derecha en comparación con las ratas SERT^{+/+}. La falta de cualquier efecto de comportamiento de S15535 en las ratas SERT^{+/+} o SERT^{-/-} es bastante desconcertante. Aparentemente, la actividad antagonista del receptor 5-HT_{1A} en los heterorreceptores 5-HT_{1A} en ratas SERT^{-/-} no causó inhibición del comportamiento sexual masculino como el tratamiento con WAY100,635 (Chan et al., 2011). El efecto estimulante de ambos fármacos F13714 y F15599 en el comportamiento sexual masculino en ratas SERT^{+/+} y SERT^{-/-} también es bastante desconcertante; por ello, hacer explicaciones en términos de mecanismos de receptores 5-HT_{1A} pre o postsinápticos involucrados resulta problemático. Sin embargo, sigue siendo posible que el agonista posináptico preferencial al receptor 5-HT_{1A} F15599, a dosis más altas (como en este experimento) también muestre cierta actividad agonista presináptica del autorreceptor. En ese caso, F15599 no parece la herramienta específica para activar selectivamente los heterorreceptores 5-HT_{1A} postsinápticos.

¿Cómo se comparan los datos sexuales obtenidos con estos tres ligandos serotoninérgicos con sus efectos en otros sistemas conductuales? El grupo de investigación de De Boer (Sietse F. de Boer

& Newman-Tancredi, 2016) han evaluado estos (y otros) ligandos, ampliamente en modelos de agresión ofensiva en ratas macho Wildtype Groningen (WTG). En la agresión ofensiva de ratas macho (de Boer et al., 1999; 2000), el 8-OH-DPAT redujo la agresión ofensiva de manera potente y dependiente de la dosis, pero también indujo fuertes comportamientos similares a los sedantes. Debido a que los agonistas del receptor 5-HT_{1A} inducen el llamado síndrome serotoninérgico, caracterizado por la retracción del labio inferior, el avance de la pata delantera y la postura del cuerpo plano; no queda completamente claro si la actividad sedante es similar a estos comportamientos serotoninérgicos. Estos efectos anti agresivos y otros del 8-OH-DPAT pueden ser completamente antagonizados por WAY100,635 (de Boer et al., 1999; 2000), un antagonista silencioso en la agresión ofensiva. F13714, F15599 y S15535 reducen la agresión ofensiva (de Boer & Newman-Tancredi, 2016). Tanto F13714 como F15599 inducen un síndrome serotoninérgico en ratas (Assié et al., 2010; Jastrzębska-Więsek et al., 2018; Newman-Tancredi et al., 2009). S15535 no induce el síndrome serotoninérgico-5-HT_{1A} en absoluto (de Boer & Newman-Tancredi, 2016; Jastrzębska-Więsek et al., 2018) y tampoco tiene actividad sedante en la agresión ofensiva (de Boer et al., 2000). WAY100,635 antagonizó la acción anti agresiva de S15535, F15599 y F13714 (de Boer & Newman-Tancredi, 2016).

Si los mecanismos de acción de los tres ligandos 5-HT_{1A} investigados ampliamente por varios grupos de investigación son verdaderos, las explicaciones mecanicistas de los efectos conductuales encontrados en el comportamiento sexual masculino son bastante difíciles de explicar. Los autorreceptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} en los núcleos del rafe generalmente se consideran, tras su activación, que conducen a la inhibición de la activación celular y, en consecuencia, a una disminución de la liberación de serotonina. Posteriormente, todos los receptores 5-HT (hetero) postsinápticos (incluidos los heterorreceptores 5-HT_{1A}) reciben estimulación disminuida o nula

por parte de la serotonina y, dependiendo del acoplamiento del receptor postsináptico a los diferentes mecanismos de transducción, la neurona involucrada se activará o inhibirá (Jastrzębska-Więsek et al., 2018). En el caso de un agonista del receptor 5-HT_{1A} no selectivo como el 8-OH-DPAT, junto a su acción inhibitoria en la neurona serotoninérgica, la estimulación directa del heterorreceptor 5-HT_{1A} todavía se produce y esto genera efectos mediados sinápticamente, como el síndrome conductual serotoninérgico (Berendsen, Broekkamp, & Van Delft, 1990; Jastrzębska-Więsek et al., 2018). En el caso de F13714, un agonista del autorreceptor 5-HT_{1A} relativamente selectivo (en comparación con el heterorreceptor; Assié et al., 2006) facilitó de manera potente la actividad sexual en ratas macho SERT^{+/+} lo que sugiere que la actividad pro sexual está relacionada con la activación de los autorreceptores 5-HT_{1A}. El agonista al heterorreceptor 5-HT_{1A} relativamente selectivo, F15599 también facilitó la actividad sexual masculina en ratas SERT^{+/+}. La diferencia en la potencia (diferencia del factor 256) para obtener la actividad pro sexual (a la dosis efectiva más baja) puede explicarse posiblemente por la diferencia de la afinidad y eficacia *in vitro* e *in vivo* de ambos compuestos en los receptores 5-HT_{1A} (Assié et al., 2010; Jastrzębska-Więsek et al., 2018; Newman-Tancredi, 2011). Esto podría tomarse como sugerencia de que ambos compuestos ejercen actividad pro sexual a través de la activación de los autorreceptores 5-HT_{1A}. Por extraño que parezca, ambos compuestos también promueven el síndrome serotoninérgico (Becker et al., 2016; Newman-Tancredi, 2011). El agonista del autorreceptor 5-HT_{1A} S15535 no induce un comportamiento pro sexual, ni en ratas con comportamiento normal ni con comportamiento sexual bajo. Si el bloqueo de los heterorreceptores 5-HT_{1A} postsinápticos antagoniza el efecto pro sexual esperado de la estimulación del autorreceptor es bastante difícil de imaginar. Esto supondría un nivel bastante alto de actividad basal de los heterorreceptores 5-HT_{1A} involucrados en el comportamiento sexual. Curiosamente, Pattij et al. (2005) mostraron que los

eyaculadores lentos, normales y rápidos eyacularon más después del tratamiento con 8-OH-DPAT, sin embargo, cuando las ratas fueron expuestas a una prueba más , una semana después de esta administración del agonista del receptor 5-HT_{1A}, todos los fenotipos volvieron a los niveles de comportamiento eyaculatorio encontrados antes del tratamiento con 8-OH-DPAT. En el presente estudio, encontramos que durante las semanas en que se administró el tratamiento con S155355, los grupos a los que se les administró solución salina (y, por lo tanto, los niveles basales) mostraron frecuencias de eyaculación significativamente más altas en comparación con las frecuencias de eyaculación durante las semanas de entrenamiento. Esto podría sugerir que los efectos pro sexuales consecuentes al agonista del receptor 5-HT_{1A} pueden ser duraderos, muy probablemente debido a alteraciones en los receptores 5-HT_{1A}. Se requiere más investigación para poner en claro cuánto tiempo persistirá este efecto, y si 1 semana después de todos los tratamientos con agonistas del receptor 5-HT_{1A}, y sin tratamiento con solución salina, todavía se encuentra presente.

Las ratas SERT^{-/-}, son un modelo animal de actividad serotoninérgica alterada de forma permanente en el cerebro (Homberg et al., 2007) y asociado con un fenotipo sexual alterado (Chan et al., 2011) pueden ser útiles para explicar los efectos conductuales encontrados para estos tres compuestos. Chan y col. (2011) han encontrado que el 8-OH-DPAT tiene efectos pro sexuales en ratas SERT^{-/-} machos, aunque la curva dosis-respuesta se ha desplazado hacia la derecha en comparación con las ratas SERT^{+/+}. Sorprendentemente, WAY100,635, un antagonista no selectivo del receptor 5-HT_{1A} y sin ningún efecto conductual en los machos SERT^{+/+}, fue inhibitorio (dependiente de la dosis) en ratas SERT^{-/-}. WAY100,635 pudo antagonizar completamente los efectos pro sexuales de 8-OHDPAT en ratas SERT^{+/+} pero solo parcialmente en ratas SERT^{-/-} (Chan et al., 2011). Con estos datos, concluimos que la ausencia total de moléculas SERT había

provocado alteraciones en el funcionamiento del receptor 5-HT_{1A}, planteando la hipótesis de que un grupo de receptores 5-HT_{1A} media los efectos pro sexuales de la estimulación del receptor 5-HT_{1A} y no está (des)sensibilizado, mientras que otro grupo de receptores 5-HT_{1A}, que media los efectos inhibitorios de los receptores 5-HT_{1A} antagonizados, parece sensibilizado en las ratas SERT^{-/-}. La hipótesis de dos conjuntos de receptores 5-HT_{1A} regulados diferencialmente en ratas SERT^{-/-} también se ha encontrado en la regulación autónoma de la temperatura corporal y el estrés (Olivier et al., 2008). Los hallazgos con F15599 y F13714 en las ratas SERT^{-/-} no pueden explicarse en términos de acción en diferentes conjuntos de receptores 5-HT_{1A}. Si los hay, ambos compuestos parecen activar el grupo mediando los efectos pro sexuales. Los efectos antagonistas del heterorreceptor 5-HT_{1A} de S15535 no conducen a la inhibición del comportamiento sexual masculino en las ratas SERT^{-/-} de mejor desempeño (eyaculación normal), como fue el caso de WAY100,635 en el estudio de Chan et al. (2011).

Nuestra expectativa de que los agonistas preferenciales del receptor 5-HT_{1A} y un agonista mixto del receptor presináptico 5-HT_{1A} y un antagonista postsináptico pudieran ayudar a revelar la contribución potencial de estos diferentes receptores 5-HT_{1A} era demasiado optimista. Los mecanismos de acción de las respectivas moléculas son probablemente muy complejos; especialmente en redes in vivo, donde los receptores 5-HT_{1A} interactúan con otros sistemas de neurotransmisores en la modulación del comportamiento sexual masculino, por lo que se requiere más investigación.

5. Conclusión

Los datos recopilados con los experimentos farmacológicos muestran que los agonistas selectivos (preferenciales) pre y post sinápticos al receptor 5-HT_{1A} poseen efectos pro sexuales en SERT^{+/+} y SERT^{-/-}, aunque la respuesta está disminuida en animales SERT^{-/-}, muy probablemente debido a

la desensibilización de los receptores 5-HT_{1A}. El experimento farmacológico con S15535 comparado con experimentos previos realizados en agresión, muestra que, aunque la agresión y el comportamiento sexual comparten la mayor parte de su sustrato neurobiológico, al menos en el nivel del receptor 5-HT_{1A} estamos tratando con sustratos neurobiológicos separados para el comportamiento sexual y agresivo masculino en ratas, pero se necesitan más experimentos para apoyar esta idea.

6. Agradecimientos

Agradecemos a Saskia Helder y Chiara Colaprete por su excelente soporte técnico. Diana C. Esquivel es una estudiante de doctorado del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), y recibió el apoyo de la beca 191062 de CONACYT.

Tablas

Tabla 1: Rendimiento del comportamiento sexual durante las semanas de entrenamiento de las ratas macho Wistar SERT^{+/+} y SERT^{-/-} del lote 1. N = 12/grupo.

SERT	Semana								ANOVA una vía Efecto en tiempo
	1	2	3	4	5	6	7-15	16-20	
	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	
	A	B	C	D	E	F	G	H	
+/+	0.0±0.0	0.0±0.0	0.50±0.23	1.08±0.31	1.16±0.40	1.41± 0.37	1.33±0.30	2.91±0.45	F _(7,88) =9.37; p<0.001
				A,B	A,B	A,B,C	A,B	A,B,C,D, E,F,G	
-/-	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.25±0.17	0.25±0.13	0.33±0.25	0.33±0.18	1.00±0.32	F _(7,88) =3.25; p<0.01
								A,B,C,D, E,F,G	

Prueba T genotipo * semana	ns	ns	*	*	*	*	*	*	*
			T _(1,22) =2.1	T _(1,22) =2.3	T _(1,22) =2.1	T _(1,22) =2.3	T _(1,22) =2.7	T _(1,22) =3.4	
			71,	11,	54,	70,	60,	43,	
			p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.01	

2-WAY ANOVA medidas repetidas	Efecto en tiempo (semana) F _(7,154) =13.855, p<0.001
	Efecto en tiempo (semana)*genotipo F _(7,154) =3.396, p<0.01
	Efecto en genotipo F _(1,22) =23.807, p<0.001

A: significativamente diferente de la semana 1; B: significativamente diferente de la semana 2; C: significativamente diferente de la semana 3; D: significativamente diferente de la semana 4; E: significativamente diferente de la semana 5; F: significativamente diferente de la semana 6; G: significativamente diferente de la semana 7-15; Todos los valores de p son <0.05.

Tabla 2: Rendimiento del comportamiento sexual durante las semanas de entrenamiento de ratas macho Wistar SERT^{+/+} y SERT^{-/-} del lote 2. N = 10 y N = 11 respectivamente.

SERT	Semana											ANOVA de una vía Efecto en tiempo
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11-14	
	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	Media ± SEM	
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	
+/+	0.0±0.0	0.0±0.0	0.20±0.13	0.10±0.10	0.20±0.13	0.20±0.20	0.10±0.10	0.10±0.10	0.10±0.10	0.20±0.20	0.70±0.39	
-/-	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.09±0.09	0.0±0.0	0.18±0.12	0.0±0.0	0.09±0.09	0.0±0.0	0.09±0.09	0.54±0.24	A,B,C, D,E,F, G,H,I,J
T-test genotipo * semana	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	F _(10,220) =3.418, p<0.001
2-WAY ANOVA A medida s repetidas	Efecto en tiempo (semana) F _(10,190) =3.321, p<0.001											
	No efecto en tiempo (semana) * genotipo F _(10,190) =0.607, n.s.											
	No efecto en genotipo F _(1,19) =2.072, n.s.											

A: significativamente diferente de la semana 1; B: significativamente diferente de la semana 2; C: significativamente diferente de la semana 3; D: significativamente diferente de la semana 4; E: significativamente diferente de la semana 5; F: significativamente diferente de la semana 6; G: significativamente diferente de la semana 7; H: significativamente diferente de la semana 8; I: significativamente diferente de la semana 9; J: semana significativamente diferente 10; Todos los valores de p son <0.01.

Tabla 3: Efectos de F15599 sobre el comportamiento sexual de ratas macho Wistar SERT ^{+/+} y SERT ^{-/-}. N = 12/grupo.

Dosis de F-15599, mg/kg	0 mg/kg A	0.01 mg/kg B	0.04 mg/kg C	0.16 mg/kg D	0.64 mg/kg E	ANOVA una vía Efecto en dosis	
Parámetros medidos	Media ±SEM	Media ±SEM	Media ±SEM	Media ±SEM	Media ±SEM		
<i># E SERT ^{+/+}</i>	1.3±0.30	1.6±0.51	1.58±0.43	2.50±0.57	3.41±0.41		
<i>SERT ^{-/-}</i>	0.3±0.18	0.25±0.17	0.25±0.136	0±0.30	1.50±0.37		
ANOVA una vía genotipo por dosis	*	*	*	*	A,B,C *	F(4,115)=5.286, p<0.001	
ANOVA 2 vías medidas repetidas	F(1,22)= 7.615, p<0.05					F(1,22)= 6.807, p<0.05	F(1,22)= 8.638, p<0.05
	F(1,22)= 7.317, p<0.05					F(1,22)= 11.569; p<0.05	
	Efecto en dosis F(4,88)=8.747, p<0.001						
	No efecto en dosis * genotipo F(4,88)=0.594, n.s.						
	Efecto en genotipo F(1,22)=22.278, p<0.001						
<i># M I^a serie SERT ^{+/+}</i>	10.75±1.457	6.53±1.22	10.58±3.23	7.08±2.15	1.50±0.26	NA	
<i>SERT ^{-/-}</i>	12.50±4.061	10.00±2.25	13.08±2.77	17.00±3.97	10.92±2.26		
ANOVA una vía genotipo por dosis	NA	NA	NA	NA	NA		
ANOVA 2 vías medidas repetidas	Efecto en dosis F(4,88)=5.334, p<0.001						
	No efecto en dosis * genotipo F(4,88)=2.030, n.s.						
	No efecto en genotipo F(1,22)=2.962, n.s.						
<i># I I^a serie SERT ^{+/+}</i>	7.66±1.46	5.08±0.84	7.75±1.45	5.75±1.16	2.50±0.46	NA	
<i>SERT ^{-/-}</i>	5.91±2.07	4.25±1.32	5.66±1.76	7.41±1.22	6.50±1.14		
ANOVA una vía genotipo por dosis	NA	NA	NA	NA	NA		
ANOVA 2 vías medidas repetidas	No efecto en dosis F(4,88)=1.707, n.s						
	No efecto en dosis * genotipo F(4,88)=2.114, n.s.						
	No efecto en genotipo F(1,22)=0.856, n.s						
<i>Latencia I^a E (s) SERT ^{+/+}</i>	853.3±157.3	673.8±184.6	528.6±173.0	487.3±183.6	88.67±29.8		
<i>SERT ^{-/-}</i>	1689.4±75.8	1589±131.2	1686±62.3	1272±177.2	1063±184.9		

ANOVA una vía genotipo por dosis	*	*	*	*	A,B,C *	F(4,115)= 3.010; p<0.05
	F(1,22)= 22.922, p<0.001	F(1,22)= 16.335, p<0.01	F(1,22)= 39.601, p<0.001	F(1,22)= 9.466, p<0.05	F(1,22)= 27.033, p<0.001	
ANOVA 2 vías medidas repetidas	Efecto en dosis F(4,88)=7.446, p<0.001					
	No efecto en dosis * genotipo F(4,88)=0.525, n.s.					
	Efecto en genotipo F(1,22)=77.110, p<0.001					
<i>Latencia I^a M (s)</i>						
<i>SERT +/+</i>	155.5±71.6	260.0±146.7	232.2±150.7	23.8±8.8	211.9±146.8	NA
<i>SERT -/-</i>	619.6±251.7	491.3±228.4	365.1±195.6	208.0±147.8	322.3±192.9	
ANOVA una vía genotipo por dosis	NA	NA	NA	NA	NA	
ANOVA 2 vías medidas repetidas	No efecto en dosis F(4,88)=1.260, n.s.					
	No efecto en dosis * genotipo F(4,88)=1.260, n.s.					
	No efecto en genotipo F(1,22)=1.906, n.s.					
<i>Latencia I^a I (s)</i>						
<i>SERT +/+</i>	302.6±152.4	371.3±145.3	397.1±186.1	382.1±148.2	300.2±159.2	NA
<i>SERT -/-</i>	770.1±262.5	782.6±259.4	663.7±226.4	252.4±193.2	342.8±191.0	
ANOVA una vía genotipo por dosis	NA	NA	NA	NA	NA	
ANOVA 2 vías medidas repetidas	No efecto en dosis F(4,88)=1.418, n.s.					
	No efecto en dosis * genotipo F(4,88)=0.532, n.s.					
	No efecto en genotipo F(1,22)=2.252, n.s.					
<i>IR_I SERT +/+</i>	35.5±4.4	42.8±6.6	45.0±6.2	49.0±7.4	55.9±6.4	
<i>SERT -/-</i>	16.8±5.1	18.0±5.2	20.2±4.7	30.7±6.1	37.6±5.6	
ANOVA una vía genotipo por dosis	*	*	*	*	A,B,C ns	F(4,115)= 3.111, p<0.05
	F(1,22)= 7.501, p<0.05	F(1,22)= 8.580, p<0.01	F(1,22)= 9.943, p<0.05	F(1,22)= 3.608, p<0.05		
ANOVA 2 vías medidas repetidas	Efecto en dosis F(4,88)=4.566, p<0.01					
	No efecto en dosis * genotipo F(4,88)=0.205, n.s.					
	Efecto en genotipo F(1,22)=19.573, p<0.001					

A: diferencia significativa en comparación con el grupo de solución salina, B: diferencia significativa en comparación con el grupo de 0.01 mg/kg, C: diferencia significativa en comparación con el grupo de 0.04 mg/kg, valores de p establecidos en <0.05 (para valores de p específicos, vaya a las secciones de resultados) . *: diferencia significativa entre SERT^{+/+} y SERT^{-/-} (p <0.05).

Tabla 4: Efectos de F13714 sobre el comportamiento sexual de ratas macho Wistar SERT^{+/+} y SERT^{-/-}. N = 12 / grupo.

Dosis de F-13714, mg/kg	0 mg/kg A	0.0025 mg/kg B	0.01 mg/kg C	0.04 mg/kg D	0.16 mg/kg E	ANOVA de una vía Efecto en dosis
Parámetros medidos	Media ±SEM	Media ±SEM	Media ±SEM	Media ±SEM	Media ±SEM	
# E SERT ^{+/+}	1.33±0.30	2.91±0.31	2.41±0.43	2.75±0.46	1.41±0.41	F(4,55)= 3.607, p<0.05
SERT ^{-/-}	0.33±0.18	0.25±0.17	0.66±0.30	1.08±0.35	1.33±0.44	F(4,55)= 2.230, p=0.078
ANOVA una vía genotipo por dosis	*	*	*	*	A,B ns	
	F(1,22)=7.615, p<0.05	F(1,22)=54.680, p<0.01	F(1,22)=10.156, p<0.01	F(1,22)=8.118, p<0.01		
ANOVA 2 vías medidas repetidas	Efecto en dosis F(4,88)=3.287, p<0.05 Efecto en dosis * genotipo F(4,88)=4.810, p<0.01 Efecto en genotipo F(1,22)=20.649, p<0.001					
# M 1ª serie SERT ^{+/+}	10.7±1.45	9.6±2.68	12.3±4.11	6.5±1.22	1.6±1.23	
SERT ^{-/-}	12.5±4.06	13.4±2.63	12.9±4.44	15.3±3.88	1.4±0.4345	
ANOVA una vía genotipo por dosis	ns	ns	ns	*	A,B,C,D ns	F(4,115)=4.476, p<0.01
				F(1,22)=11.642, p<0.01		
ANOVA 2 vías medidas repetidas	Efecto en dosis F(4,88)=2.285, p=0.06 No efecto en dosis * genotipo F(4,88)=1.294, n.s. Efecto en genotipo F(1,22)=6.943, p<0.05					
# I 1ª serie SERT ^{+/+}	7.6±1.46	6.0±0.60	5.5±1.17	2.1±0.62	1.1±0.56	F(4,55)= 8.194; p<0.001
SERT ^{-/-}	5.9±2.07	4.6±1.53	6.0±1.22	7.16±1.61	2.9±0.88	F(4,55)= 1.128; n.s.
ANOVA una vía genotipo por dosis	ns	ns	ns	*	ns	
				F(1,22)=8.305, p<0.01		
ANOVA 2 vías medidas repetidas	Dose effect F(4,88)=5.308, p<0.01 Dose*Genotype effect F(4,88)=3.128, p<0.05 No efecto en genotipo F(1,22)=0.510, n.s.					
Latencia 1ª E (s) SERT ^{+/+}	853.3±157.3	379.3±91.56	504.4±178.2	196.3±68.59	215.3±133.4	
SERT ^{-/-}	1689.4±75.8	1664±97.59	1411±169.8	1303±186.2	1004±219.3	
ANOVA una vía genotipo por dosis	*	*	*	*	*	F(4,115)= 1.293; n.s.
	F(1,22)=22.922, p<0.001	F(1,22)=92.148, p<0.001	F(1,22)=13.568, p<0.01	F(1,22)=31.127, p<0.001	F(1,22)=9.429, p<0.01	
ANOVA 2 vías medidas repetidas	Efecto en dosis F(4,88)=7.604, p<0.001 Efecto en dosis * genotipo F(4,88)=1.253, p<0.05 Efecto en genotipo F(1,22)=62.797, p<0.001					

<i>Latencia I^a M (s)</i>						
<i>SERT +/+</i>	155.5±71.6	44.17±19.21	170.8±148.3	369.0±195.7	858.3±221.2	
<i>SERT -/-</i>	619.6±251.7	512.1±227.0	296.4±182.36	327.2±198.8	635.5±221.2	
ANOVA una vía genotipo por dosis	*	ns	ns	ns	ns	F(4,115)= 2.315, n.s.
	F(1,22)=3.144, p<0.05					
ANOVA 2 vías medidas repetidas	Efecto en dosis F(4,88)=3.160, p<0.05 No efecto en dosis * genotipo F(4,88)=1.79, n.s. Efecto en genotipo F(1,22)=22.47, p<0.001					
<i>Latencia I^a I (s)</i>						
<i>SERT +/+</i>	302.6±152.4	120.4±50.65	201.8±146.0	472.2±192.2	945.9±209.2	F(4,115)= 4.203, p<0.01
<i>SERT -/-</i>	770.1±262.5	722.86±211.3	319.7±181.0	342.6±197.0	832.5±234.0	F(4,115)= 1.266, n.s.
ANOVA una vía genotipo por dosis	ns	*	ns	ns	ns	
		F(1,22)=7.682, p<0.05				
ANOVA 2 vías medidas repetidas	Efecto en dosis F(4,88)=4.628, p<0.001 Efecto en dosis * genotipo F(4,88)=2.298, p<0.05 No efecto en genotipo F(1,22)=1.029, n.s.					
<i>IR_I SERT +/+</i>	35.5±4.4	45.3±4.47	42.2±8.22	49.8±10.64	37.3±11.99	NA
<i>SERT -/-</i>	16.8±5.1	17.3±5.19	34.4±5.47	34.1±8.11	41.0±11.00	
ANOVA una vía genotipo por dosis	NA	NA	NA	NA	NA	
ANOVA 2 vías medidas repetidas	No efecto en dosis F(4,88)=1.514, n.s. No efecto en dosis * genotipo F(4,88)=1.291, n.s. No efecto en genotipo F(1,22)=1.029, n.s.					

A: diferencia significativa en comparación con el grupo de solución salina, B: diferencia significativa en comparación con el grupo de 0.0025 mg/kg, C: diferencia significativa en comparación con el grupo de 0.01 mg/kg, D: diferencia significativa en comparación con los valores de p del grupo 0.04 mg/kg establecidos en <0.05 (para valores de p específicos, vaya a las secciones de resultados). *: diferencia significativa entre SERT^{+/+} y SERT^{-/-} (p <0.05).

Tabla 5: Efectos de S15535 sobre el comportamiento sexual de las ratas macho Wistar SERT^{+/+} y SERT^{-/-} del lote uno. N = 12 / grupo.

Dosis de S-15535 mg/kg	0 mg/kg	0.25 mg/kg	1 mg/kg	.4 mg/kg	ANOVA una vía Efecto en dosis
Parámetros medidos	Media ±SEM	Media ±SEM	Media ±SEM	Media ±SEM	
# E SERT +/+	3.2±0.39	2.4±0.49	2.9±0.45	2.5±0.41	NA
SERT -/-	1.1±0.32	0.9±0.28	1.0±0.32	1.0±0.31	
ANOVA una vía genotipo por dosis	*	*	*	*	
	F(1,22)=11.851, p<0.001	F(1,22)=6.776, p<0.001	F(1,22)=6.069, p<0.05	F(1,22)=11.380, p<0.001	
ANOVA 2 vías medidas repetidas	No efecto en dosis F(3,66)=0.616, n.s. No efecto en dosis * genotipo F(4,3,66)=0.360, n.s.				

	Efecto en genotipo $F_{(1,22)}=21.167, p<0.001$				
<i># M 1ª serie</i>					
<i>SERT +/+</i>	9.2±3.03	9.6±4.05	7.5±1.65	17.4±5.86	NA
<i>SERT -/-</i>	14.1±5.12	19.0±3.99	23.1±5.43	15.1±3.92	
ANOVA una vía genotipo por dosis	NA	NA	NA	NA	
ANOVA 2 vías medidas repetidas	No efecto en dosis $F_{(3,66)}=0.439, n.s.$ No efecto en dosis * genotipo $F_{(3,66)}=1.575, n.s.$ No efecto en genotipo $F_{(1,22)}=4.45, n.s.$				
<i># I 1ª serie</i>					
<i>SERT +/+</i>	4.5±0.54	4.5±0.73	5.5±0.97	5.9±1.14	NA
<i>SERT -/-</i>	7.0±1.8	7.9±1.20	7.6±1.56	7.0±1.24	
ANOVA una vía genotipo por dosis	NA	NA	NA	NA	
ANOVA 2 vías medidas repetidas	No efecto en dosis $F_{(3,66)}=0.827, n.s.$ No efecto en dosis * genotipo $F_{(3,66)}=0.525, n.s.$ Efecto en genotipo $F_{(1,22)}=3.03, p<0.05$				
<i>Latencia 1ª E (s)</i>					
<i>SERT +/+</i>	246.7±94.03	602.6±213.0	523.7±175.8	592.5±213.1	NA
<i>SERT -/-</i>	1122±185.5	1243±172.5	1288±148.1	1153±170.3	
ANOVA una vía genotipo por dosis	*	*	*	*	
	$F_{(1,22)}=11.051, p<0.001$	$F_{(1,22)}=5.462, p<0.05$	$F_{(1,22)}=4.218, p<0.05$	$F_{(1,22)}=17.732, p<0.001$	
ANOVA 2 vías medidas repetidas	No efecto en dosis $F_{(3,66)}=0.869, n.s.$ No efecto en dosis * genotipo $F_{(3,66)}=0.346, n.s.$ Efecto en genotipo $F_{(1,22)}=25.627, p<0.001$				
<i>Latencia 1ª M (s)</i>					
<i>SERT +/+</i>	18.4±6.85	73.5±38.28	35.2±23.27	11.2±3.13	NA
<i>SERT -/-</i>	328.3±198.6	192.3±147.0	176.3±147.8	99.5±55.39	
ANOVA una vía genotipo por dosis	NA	NA	NA	NA	
ANOVA 2 vías medidas repetidas	No efecto en dosis $F_{(3,66)}=0.982, n.s.$ No efecto en dosis * genotipo $F_{(3,66)}=0.988, n.s.$ No efecto en genotipo $F_{(1,22)}=1.864, n.s.$				
<i>Latencia 1ª I (s)</i>					
<i>SERT +/+</i>	63.5±31.13	254.2±153.3	328.3±198.8	33.1±8.30	NA
<i>SERT -/-</i>	507.3±226.0	278.8±155.2	477.7±210.0	280.6±147.4	
ANOVA una vía genotipo por dosis	NA	NA	NA	NA	
ANOVA 2 vías medidas repetidas	No efecto en dosis $F_{(3,66)}=1.308, n.s.$ No efecto en dosis * genotipo $F_{(3,66)}=1.008, n.s.$ No efecto en genotipo $F_{(1,22)}=1.674, n.s.$				
<i>IR₁ SERT +/+</i>	44.4±6.19	38.7±5.20	40.3±7.51	44.2±8.0	NA
<i>SERT -/-</i>	28.2±6.39	30.6±5.16	23.5±5.08	31.6±6.3	
	*	ns	ns	*	

ANOVA una vía genotipo por dosis $F_{(1,22)}=3.440$, $p<0.05$ $F_{(1,22)}=3.294$, $p<0.05$

ANOVA 2 vías medidas repetidas
 No efecto en dosis $F_{(3,66)}=0.375$, n.s.
 No efecto en dosis * genotipo $F_{(3,66)}=0.228$, n.s.
 Efecto en genotipo $F_{(1,22)}=6.648$, $p<0.05$

*: significativamente diferente entre $SERT^{+/+}$ y $SERT^{-/-}$ ($p<0.05$).

Tabla 6: Efectos de S15535 en el comportamiento sexual de ratas macho Wistar $SERT^{+/+}$ y $SERT^{-/-}$ del lote dos. N = 10 y N = 11 respectivamente.

Dosis de S-15535 mg/kg	0 mg/kg A	0.25 mg/kg B	1 mg/kg C	.4 mg/kg D	ANOVA una vía Efecto en dosis
Parámetros medidos	Media \pm SEM	Media \pm SEM	Media \pm SEM	Media \pm SEM	
# E $SERT^{+/+}$ $SERT^{-/-}$	0.70 \pm 0.39 0.54 \pm 0.24	1.00 \pm 0.47 0.54 \pm 0.31	0.90 \pm 0.31 0.90 \pm 0.25	1.00 \pm 0.39 1.36 \pm 0.45	NA
ANOVA una vía genotipo por dosis	NA	NA	NA	NA	
ANOVA 2 vías medidas repetidas	No efecto en dosis $F_{(3,57)}=0.582$, n.s. No efecto en dosis * genotipo $F_{(3,57)}=0.524$, n.s. No efecto en genotipo $F_{(1,19)}=0.031$, n.s.				
# M $SERT^{+/+}$ $SERT^{-/-}$	19.20 \pm 1.34 17.45 \pm 2.836	10.70 \pm 3.11 14.18 \pm 2.67	20.00 \pm 4.03 17.82 \pm 2.40	12.20 \pm 3.60 12.18 \pm 3.43	A,C NA
ANOVA una vía genotipo por dosis	NA	NA	NA	NA	$F_{(3,80)}=2.946$, $p<0.05$
ANOVA 2 vías medidas repetidas	Efecto en dosis $F_{(3,57)}=3.161$, $p<0.05$ No efecto en dosis * genotipo $F_{(3,57)}=0.393$, n.s. No efecto en genotipo $F_{(1,19)}=0.002$, n.s.				
# I $SERT^{+/+}$ $SERT^{-/-}$	14.30 \pm 3.66 12.27 \pm 2.12	7.70 \pm 2.20 8.36 \pm 2.05	12.50 \pm 1.56 13.55 \pm 2.15	8.70 \pm 3.01 11.64 \pm 4.04	NA
ANOVA una vía genotipo por dosis	NA	NA	NA	NA	
ANOVA 2 vías medidas repetidas	No efecto en dosis $F_{(3,57)}=1.751$, n.s. No efecto en dosis * genotipo $F_{(3,57)}=0.293$, n.s. No efecto en genotipo $F_{(1,19)}=0.101$, n.s.				
Latencia 1ª E (s) $SERT^{+/+}$ $SERT^{-/-}$	1458 \pm 171.3 1490 \pm 140.6	1324 \pm 203.9 1440 \pm 189.6	1324 \pm 168.4 1256 \pm 149.6	1254 \pm 192.8 1194 \pm 196	NA
ANOVA una vía genotipo por dosis	NA	NA	NA	NA	
ANOVA 2 vías medidas repetidas	No efecto en dosis $F_{(3,57)}=2.049$, n.s. No efecto en dosis * genotipo $F_{(3,57)}=0.436$, n.s. No efecto en genotipo $F_{(1,19)}=0.011$, n.s.				
Latencia 1ª M (s) $SERT^{+/+}$ $SERT^{-/-}$	52.00 \pm 15.96 48.16 \pm 11.60	209.5 \pm 176.8 98.48 \pm 52.75	56.67 \pm 26.87 24.32 \pm 5.28	218.2 \pm 176.5 77.22 \pm 41.22	NA

ANOVA una vía genotipo por dosis	NA	NA	NA	NA	
ANOVA 2 vías medidas repetidas	No efecto en dosis $F_{(3,57)}=1.266$, n.s. No efecto en dosis * genotipo $F_{(3,57)}=1.373$, n.s. No efecto en genotipo $F_{(1,19)}=0.653$, n.s				
<i>Latencia 1ª I (s)</i>					
<i>SERT +/+</i>	256.0±86.47	530.8±221.5	77.90±31.63	517.3±223.0	NA
<i>SERT -/-</i>	82.19±10.46	567.9±240.0	97.57±52.92	537.6±244.7	
ANOVA una vía genotipo por dosis	*	ns	ns	Ns	
	$F_{(1,19)}=4.391$, $p<0.05$				
ANOVA 2 vías medidas repetidas	No efecto en dosis $F_{(3,57)}=1.266$, n.s. No efecto en dosis * genotipo $F_{(3,57)}=1.373$, n.s. Efecto en genotipo $F_{(1,19)}=6.499$, $p<0.05$				
<i>IR_I SERT +/+</i>	322.1±27.51	367.7±32.40	401.3±13.31	357.0±15.43	NA
<i>SERT -/-</i>	316.8±12.66	354.3±18.20	461.5±93.61	375.6±35.51	
ANOVA una vía genotipo por dosis	NA	NA	NA	NA	
ANOVA 2 vías medidas repetidas	No efecto en dosis $F_{(3,57)}=1.197$, n.s. No efecto en dosis * genotipo $F_{(3,57)}=0.564$, n.s. No efecto en genotipo $F_{(1,19)}=0.011$, n.s				

A: diferencia significativa en comparación con el grupo de solución salina, C: diferencia significativa en comparación con el grupo 1 mg/kg; valores de p establecidos en <0.05 (para valores de p específicos, vaya a las secciones de resultados). *: diferencia significativa entre $SERT^{+/+}$ y $SERT^{-/-}$ ($p < 0.05$).

Figura suplementaria

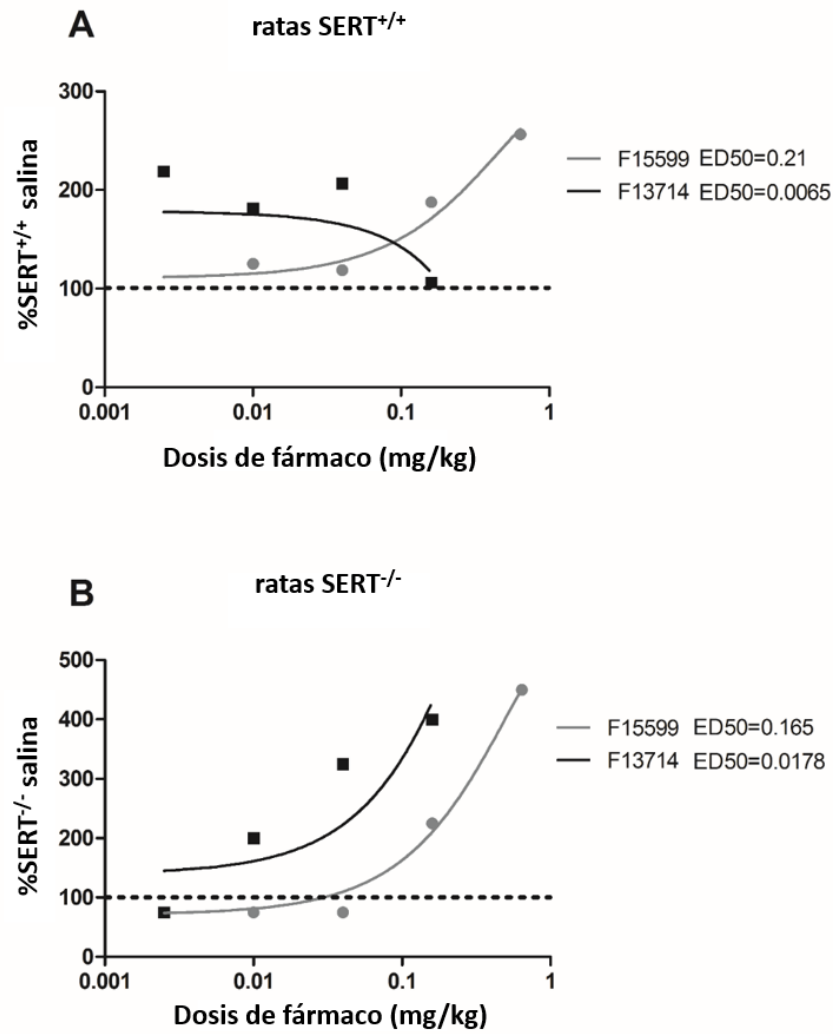


Diagrama de curva ajustado para ratas SERT^{+/+} (A) y SERT^{-/-} (B). Los datos se normalizaron frente al tratamiento con solución salina y se calculó la ED₅₀.

Capítulo 7

Discusión general

La presente tesis aprovechó un modelo de rata animal que se ha desarrollado durante las últimas décadas para estudiar el comportamiento sexual y las disfunciones de la eyaculación (eyaculación precoz y tardía; Chan et al., 2008; Olivier et al., 2011; Pattij et al., 2005). Este paradigma se ha utilizado ampliamente para evaluar varios fármacos psicoactivos (principalmente inhibidores de la recaptura de serotonina, ISRS) y sus efectos sobre el rendimiento sexual y su potencial para tratar la eyaculación precoz, ya que uno de los principales efectos secundarios de los ISRS son el aumento del tiempo necesario para eyacular (Chan et al., 2010; Heijkoop et al., 2018; Waldinger & Olivier, 2005). Hoy en día, la mayoría de los fármacos que se han probado en el pasado (paroxetina, fluoxetina, sertralina, fluvoxamina, clomipramina, etc.; (Jannini et al., 2002; Jannini & Lenzi, 2005)), han sido reconocidos como tratamientos eficientes para la eyaculación precoz. En la depresión, los ISRS administrados crónicamente tienen efectos secundarios sexuales que tienen un gran impacto negativo que a menudo conduce a la finalización o suspensión del tratamiento, pero es probablemente que este efecto secundario inhibitor sexual sea el que aporta el valor terapéutico de los ISRS en el tratamiento de la EP..

Uno de los objetivos de este proyecto fue evaluar el uso de una rata modificada genéticamente del transportador de serotonina (SERT), como un modelo animal que refleja las consecuencias de la función sexual perturbada por la administración crónica de ISRS y obtener una mayor comprensión de los mecanismos involucrados. Este modelo animal modificado genéticamente también nos ayudaría a desentrañar los mecanismos cerebrales y farmacológicos relacionados con las (dis)funciones sexuales.

Con este fin, evaluamos el comportamiento sexual de un gran número de ratas macho genéticamente modificadas del SERT, incluidos los genotipos SERT^{+/+}, SERT^{+/-} y SERT^{-/-}. Realizamos varios estudios farmacológicos que nos permitieron establecer la rata macho SERT^{-/-} como un modelo animal que se parece mucho a los efectos de la exposición crónica a los ISRS en el comportamiento sexual en ratas macho. Al mismo tiempo evaluamos los efectos de varios fármacos (tramadol, antagonista del receptor opioide μ y (ant)agonistas del receptor 5-HT_{1A}) con diferentes perspectivas: 1) para determinar si estos fármacos psicoactivos con sus propias características tenían efectos diferenciales en animales que carecen del transportador de serotonina en comparación con las ratas de tipo salvaje y 2) para analizar los mecanismos de acción de esas drogas en el comportamiento sexual. En esta discusión general, discutimos estos temas desde una perspectiva más amplia e hipotetizamos sobre sus contribuciones a nuestra investigación.

Mecanismos de la (dis)función sexual

Las diferencias en la expresión del comportamiento sexual ha sido un objetivo importante de estudio (Ågmo, 1997; Bhasin & Benson, 2006; Larsson, 1956), y con el tiempo se entendió que el comportamiento copulatorio en ratas macho puede clasificarse y dividirse en (endo)fenotipos (Pattij et al., 2005). Se ha sugerido que la mayor parte de esta variación en el fenotipo sexual se relaciona con los cambios bioquímicos y las diferencias en los grupos neuronales en las áreas del cerebro anterior involucradas en el comportamiento sexual que pueden conducir a la expresión de estas categorías copuladoras o endofenotipos (Olivier et al., 2006; Pattij et al., 2005; Waldinger & Olivier, 2005). Es bien conocido que áreas como el área preóptica medial del hipotálamo (MPOA), la amígdala postero-dorsal (MePD), el núcleo dorsal anterior de la amígdala medial (MeAD), el núcleo preóptico medial (MPN), el núcleo del lecho de la estría terminal (BNST), entre muchos otros y varios neurotransmisores como el ácido gamma-aminobutírico (GABA), óxido nítrico

(NO), serotonina (5-HT), etc. están involucrados en esta regulación (Dominguez & Hull, 2005; Hull et al., 2006; Hull & Dominguez, 2007). La participación de otras áreas del cerebro o neurotransmisores de los que todavía no tenemos amplio conocimiento, es altamente probable y actualmente no existe ningún fármaco disponible en el mercado que sea capaz de curar las disfunciones sexuales (como la eyaculación precoz o tardía), lo que indica fuertemente que los modelos actuales para entender la (dis) función sexual están lejos de ser completos. En el **capítulo 2**, evaluamos si las diferencias en la organización anatómica y funcional de los sistemas sensoriales están involucradas en la regulación del comportamiento sexual. El comportamiento sexual no solo depende de las acciones de las estructuras neurales tradicionalmente estudiadas e involucradas en la motivación y la implementación del comportamiento sexual y reproductivo, sino que también depende de las contribuciones de las estructuras neurales responsables del procesamiento de la información sensorial (Georgiadis, 2012; Georgiadis & Holstege, 2005; Ruytjens et al., 2007). Encontramos que el reclutamiento neuronal cortical entre animales con diferentes niveles de comportamiento sexual es diferente; Estas diferencias se encontraron principalmente en el área conocida como la representación genital en la corteza somatosensorial (S1, grupos neuronales que responden a la estimulación sensorial en los genitales). En nuestra investigación, los animales que pueden considerarse eyaculadores normales y rápidos (que pueden parecerse a la eyaculación precoz, Pattij et al., 2005), tienen representaciones corticales más grandes de los genitales en S1, y los que se consideran eyaculadores lentos, no eyaculadores o no copuladores (que pueden parecerse a la eyaculación tardía, Pattij et al., 2005; Portillo et al., 2013), tienen una representación menor de los genitales en S1. Estos resultados apoyan la idea de que las diferencias en la expresión del comportamiento copulatorio también están reguladas por diferencias morfo-funcionales en las vías sensoriales; por lo tanto, es importante incorporar el concepto de "representaciones corporales

de tamaño relativo en la corteza somatosensorial primaria (S1)" y su correlación con la importancia funcional de los segmentos corporales caracterizados para la comprensión de los mecanismos de la función sexual.

Las diferencias encontradas en el tamaño relativo de la representación genital cortical en S1 en los diferentes genotipos sexuales, nos llevan a reflexionar sobre los mecanismos de origen. Las representaciones funcionales en la corteza cerebral están moduladas por un tono inhibitorio GABAérgico (es decir, inhibición lateral, Derdikman et al., 2003b; Lehmann et al., 2012; Sato et al., 2008). Cuando el tono de la inhibición lateral es alto, la representación funcional del área corporal estimulada se reducirá (Porter & Nieves, 2013), y sucede lo contrario cuando el tono inhibitorio es bajo (C. I. Moore et al., 1999). Por lo tanto, estas diferencias encontradas en el tamaño de las representaciones genitales corticales de animales con diferentes categorías sexuales pueden reflejar diferencias importantes en la morfología y la función de las interneuronas GABAérgicas (por ejemplo, tono inhibitorio).

Modelo animal para simular la disfunción sexual inducida por ISRS: efectos del bloqueo del transportador de serotonina en el comportamiento sexual masculino

La eyaculación precoz es una de las disfunciones sexuales masculinas más prevalentes (Bettocchi et al., 2008; Metz et al., 1997). Se ha recolectado evidencia considerable para identificar y obtener conocimiento sobre su etiología (Metz et al., 1997; Waldinger, 2005), pero hasta ahora no existe un tratamiento que cure o sea 100% efectivo por sí solo (Jannini & Lenzi, 2005; Rosen & Althof, 2008; Waldinger, 2007). Esto sugiere que el modelo anatómico que poseemos ahora para comprender una función (dis) sexual, como la EP, aún no está completo y se necesitan más estudios. Aunque la eyaculación tardía es menos frecuente que la EP, su impacto en la calidad de

vida de los hombres es tan importante como en la EP (Jannini et al., 2002; Rowland et al., 2010; Waldinger et al., 1998).

Para abordar la EP, los expertos en esta área han puesto especial atención en los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS), que ejercen efectos secundarios sobre la función sexual, v.g. disminución de la libido y aumento de la latencia de la eyaculación (Higgins et al., 2010). Si bien los ISRS pueden ser un tratamiento relativamente eficiente para la EP, conllevan algunas desventajas: 1) toma un mínimo de al menos dos semanas antes de que se observen los efectos (Ferguson, 2001; Uphouse & Guptarak, 2010) y 2) su administración crónica trae efectos secundarios, como un aumento de la latencia de la eyaculación, y aunque este efecto fue buscado por este tratamiento, los efectos secundarios pueden aumentar hasta un punto en el que el comportamiento sexual no puede realizarse en absoluto (sin eyaculación o falta de motivación) y puede ser el hacer que los pacientes suspendan el tratamiento (Waldinger, 1998).

El modelo de rata noqueada del transportador de serotonina se ha caracterizado previamente y se han descrito las consecuencias funcionales de las alteraciones del sistema serotoninérgico en los paradigmas conductuales (Homberg et al., 2007). Los animales SERT^{-/-} tienen una exposición crónica a niveles extracelulares extremadamente altos de serotonina en el cerebro (Homberg et al., 2007), lo que los convierte en un buen candidato para un modelo que se asemeja a la administración crónica de ISRS (Chan et al., 2011; Olivier et al., 2011). En el **capítulo 3**, reunimos todos los datos basales producidos durante las sesiones de capacitación de nuestro trabajo experimental; probamos un gran número de animales modificados genéticamente del SERT (SERT^{+/-} y SERT^{-/-}) y los comparamos con ratas de tipo salvaje (SERT^{+/+}). Aunque se ha propuesto previamente que estos animales podrían usarse como modelo animal de disfunción sexual crónica inducida por ISRS (Chan et al., 2011); demostramos que la diferencia en la función sexual entre los animales SERT^{+/+}

y SERT^{-/-} puede ser detectada desde la segunda semana en que las ratas macho fueron evaluadas sexualmente. Aunque se demostró previamente que, a nivel molecular y neuroquímico, SERT^{+/+} son diferentes de las ratas SERT^{+/-} y SERT^{-/-}, nuestros resultados (que han sido corroborados en cada estudio farmacológico) muestran que no hay diferencia entre SERT^{+/+} y SERT^{+/-}, al menos a nivel del comportamiento sexual. Esto podría deberse a un mecanismo de compensación que los animales SERT^{+/-} han desarrollado, ya que estos animales tienen solo el 50% de los transportadores presentes, lo que sugiere que se necesita una disponibilidad mínima de transportadores 5-HT para poder realizar el funcionamiento sexual normal (Olivier et al., 2011).

Una vez más, nuestro estudio ilustró la importancia de la serotonina en la expresión del comportamiento sexual masculino, ya que se conoce que un aumento o disminución en los niveles y la actividad de este neurotransmisor puede inhibir o facilitar el comportamiento (Hull et al., 2004; Olivier et al., 2019; Waldinger & Olivier, 2005). Los datos anteriores (Homberg et al., 2007) mostraron que las ratas SERT^{-/-} tienen niveles extracelulares de serotonina aumentados en el cerebro en comparación con las ratas SERT^{+/+}, y que este alto nivel de la serotonina se produjo junto con una disminución en el rendimiento del comportamiento sexual de ratas macho que aparentemente no puede compensarse incluso cuando se proporciona un entrenamiento extenso (Chan et al., 2011). Los animales SERT^{-/-} han cambiado la sensibilidad del receptor 5-HT_{1A} (Olivier et al., 2008) y estos receptores son clave en la expresión del comportamiento sexual porque los agonistas del receptor 5-HT_{1A} lo estimulan (Snoeren et al., 2014). La administración crónica de ISRS desensibiliza los receptores 5-HT_{1A} (revisado en: Olivier et al., 2011) y aumenta los niveles de serotonina extracelular que podrían ser responsables de la menor frecuencia de eyaculación; en conjunto, estos efectos muestran que la rata SERT^{-/-} macho es un modelo animal

que se asemeja a la disfunción sexual inducida por la administración crónica de ISRS (Chan et al., 2011).

Estudios farmacológicos en modelos animales y tratamiento de la disfunción sexual.

Algunos de los tratamientos más comunes y relativamente exitosos para la eyaculación precoz son los productos farmacéuticos (principalmente ISRS), que se dirigen al SERT y varios receptores 5-HT (Bettocchi et al., 2008; Jannini & Lenzi, 2005). Aunque estos tratamientos han demostrado modificar significativamente la neurotransmisión de serotonina cuando se administran de forma crónica, pueden desarrollar efectos contrarios a los esperados, como una dificultad para eyacular y, por lo tanto, algunos pacientes pueden terminar abandonando el tratamiento (Jannini & Lenzi, 2005; Waldinger, 1998). Para lograr los efectos farmacológicos esperados de estos medicamentos, es necesario dosificarlos de forma crónica, pero al mismo tiempo pueden surgir efectos secundarios que conduzcan a la disfunción sexual (Montejo-González et al., 1997; Waldinger, 1998), llevando a la búsqueda de mejores tratamientos y especialmente aquellos “a demanda” para facilitar el curso del tratamiento (Waldinger, 2006).

En los **capítulos 4 y 5** de esta tesis investigamos los efectos del tramadol, comúnmente utilizado como analgésico (Matthiesen et al., 1998; Sheikholeslami et al., 2016), como un tratamiento supuestamente agudo a demanda de la eyaculación precoz, estableciendo al mismo tiempo que su mecanismo de acción predominante en la corrección de la disfunción sexual se debe principalmente a sus propiedades inhibitoras del transportador de serotonina. Primero (**capítulo 4**) realizamos un conjunto de experimentos en ratas macho de la cepa Wistar de tipo salvaje y seguimos con estudios en los animales SERT^{+/+} y SERT^{-/-} (**capítulo 5**) para explorar más a fondo si los efectos agudos del tramadol sobre la función sexual están relacionados con su ISRS y tiene muy poco que ver con sus propiedades como agonista del receptor opioide μ o antagonista del

receptor de noradrenalina. Reportamos que dosis agudas de tramadol de hasta 40 mg/kg (IP) no tienen ningún efecto sobre el comportamiento sexual en animales que muestran niveles normales de comportamiento sexual. Sin embargo, cuando se administró una dosis muy alta (50 mg/kg IP), el tramadol inhibió el comportamiento sexual. Para evaluar los posibles mecanismos de acción de este fármaco, intentamos antagonizar sus efectos con WAY100,635 (un antagonista del receptor 5-HT_{1A}) y naloxona (un antagonista del receptor opioide μ); ambos fármacos no tuvieron efectos intrínsecos sobre el comportamiento sexual cuando se administraron en animales de tipo salvaje. Cuando tramadol, a una dosis seleccionada que por sí sola no altera el comportamiento sexual, se combinó con WAY100,635 (1 mg/kg), encontramos una disminución robusta en el comportamiento sexual, lo que respalda la hipótesis de que el tramadol posee un mecanismo inhibitorio de recaptura de 5-HT que afecta el comportamiento sexual. Una dosis baja de naloxona (10 mg/kg) tuvo algunos efectos antagonistas menores cuando se combinó con la dosis inhibidora de tramadol (50 mg/kg), lo que sugiere que el receptor opioide μ puede estar jugando un papel menor en este efecto. De acuerdo con este hallazgo, la morfina, un fuerte agonista del receptor de opiáceos μ inhibe el comportamiento sexual masculino en ratas (Ågmo & Paredes, 1988; McIntosh et al., 1980); un efecto que puede ser antagonizado por la naloxona.

En este primer conjunto de experimentos, nuestros resultados indican que los efectos inhibitorios del tramadol sobre el comportamiento sexual después de la administración aguda y en dosis altas están mediados principalmente a través de su componente ISRS, aunque un pequeño efecto de su mecanismo agonista de opioides μ también podría estar contribuyendo a este efecto inhibitorio (Olivier et al., 2017). Para investigar más a fondo si la propiedad ISRS del tramadol desempeñó un papel principal en los efectos inhibitorios sobre el comportamiento sexual o si los fuertes efectos observados después de una dosis alta aguda fueron el resultado de otros mecanismos de acción de

este fármaco, evaluamos el tramadol en animales SERT^{+/-} y SERT^{-/-}. La falta de SERT excluiría el componente ISRS en el mecanismo de acción del tramadol en sus efectos inhibidores sexuales y sería de gran ayuda para desentrañar el mecanismo de acción principal del tramadol; básicamente, repetimos los experimentos realizados en el capítulo 4, incluidos estos animales. Para nuestra sorpresa y contrario a lo que esperábamos (debido a la falta de SERT, pensamos que el tramadol debería tener muy poco o ningún efecto en los animales SERT^{-/-}), las altas dosis agudas de tramadol (IP) inhibieron significativamente el rendimiento sexual de todos los genotipos SERT, con la dosis más alta de 50 mg/kg casi reduciendo la actividad a cero. Estos hallazgos replicaron nuestros resultados anteriores con animales de tipo salvaje (Capítulo 4, Olivier et al., 2017). Por lo tanto, nos centramos en obtener una mayor comprensión acerca de si los efectos observados después de la administración de tramadol en el comportamiento sexual fueron una consecuencia de sus efectos inhibidores de la recaptura de 5-HT o la acción del receptor de opiáceos μ . Los efectos de todos los fármacos y dosis utilizados en el experimento (tramadol, WAY100,635, naloxona y combinaciones) en ratas heterocigotas SERT^{+/-} no se desviaron realmente de los de SERT^{+/+}, por lo que no utilizamos los datos SERT^{+/-} y no se discutirán más aquí. Presumimos que el agonismo para el receptor de opiáceos μ presente también en el tramadol podría haber causado la inhibición de la acción sexual en las ratas SERT^{-/-}. De ser así, podría esperarse que la naloxona hubiera antagonizado la disminución en el comportamiento sexual en ratas SERT^{-/-} inducida por el tramadol. Sin embargo, la dosis de 20 mg/kg de naloxona que usamos no pudo contrarrestar el efecto del tramadol sobre la frecuencia de eyaculación y no tuvo más efectos inhibidores sobre otros parámetros sexuales. Este resultado sugiere que la sensibilidad del sistema opioide μ en el cerebro de las ratas SERT^{-/-} no es diferente debido a la ausencia de SERT. Hasta ahora, no hay datos disponibles sobre la sensibilidad del sistema opioide de las ratas SERT^{-/-}, pero la evidencia

en ratones $SERT^{-/-}$ sugiere que la sensibilidad a los efectos analgésicos del agonista de opioides μ no ha sido alterada (Hall et al., 2011). En conjunto, esto sugiere que hay otras propiedades del tramadol que tienen una contribución más importante a sus efectos inhibitorios sobre las actividades sexuales masculinas que el sistema opioide. El tramadol tiene efectos de recaptura del transportador de noradrenalina que también deben considerarse (Frink et al., 1996; Rojas-Corrales et al., 1998). Otra posibilidad es que los transportadores de noradrenalina (NET) hayan asumido (al menos en cierta medida) el papel de SERT para compensar la pérdida del transportador en la rata $SERT^{-/-}$. Existe alguna evidencia de que estos animales $SERT^{-/-}$ tienen sistemas catecolaminérgicos que se han adaptado para compensar una neurotransmisión serotoninérgica alterada (Berend Olivier et al., 2011). Es necesario realizar más experimentos para descartar el papel de NET en los efectos observados de tramadol; la evidencia preliminar con atomoxetina (un inhibidor de NET, datos no mostrados), no señaló diferencias en el comportamiento sexual en ratas $SERT^{+/+}$ y $SERT^{-/-}$, lo que sugiere que los efectos del tramadol se deben principalmente a cambios en el sistema serotoninérgico.

En general, los datos recopilados respaldan la idea de que la acción inhibitoria del tramadol sobre el comportamiento sexual proviene principalmente del bloqueo del transportador de serotonina, un mecanismo que en los ISRS es responsable del aumento de la latencia de la eyaculación, lo que hace que el tramadol sea un buen candidato para tratar la EP en varones humanos, aunque los efectos secundarios pueden ser más extensos o diferentes de los ISRS solos.

Finalmente, durante toda la trayectoria del presente trabajo, hemos enfatizado la relevancia de los receptores 5-HT_{1A} en la regulación del comportamiento sexual. En el **capítulo 6** investigamos y tratamos de comprender mejor su papel mediante el uso de dos diferentes agonistas preferenciales del receptor 5-HT_{1A} en animales $SERT^{+/+}$ y $SERT^{-/-}$. Como se ha descrito, la estimulación de este

receptor mejora la actividad sexual, y en este capítulo nos enfocamos en animales que durante sus sesiones de entrenamiento realizaron un nivel sexual relativamente bajo, de modo que pudiéramos evaluar si los fármacos de selección tenían un efecto pro sexual. Luego utilizamos dos agonistas preferenciales del receptor 5-HT_{1A}, el agonista del selectivo del autorreceptor 5-HT_{1A}, F13714 (Assié et al., 2006; Becker et al., 2016) y el agonista selectivo del heterorreceptor 5-HT_{1A}, F15599 (Becker et al., 2016; Newman-Tancredi et al., 2009), y los probamos en ratas SERT^{+/+} y SERT^{-/-}. Algo sorprendente, fue que ambos compuestos indujeron actividad pro sexual en ratas SERT^{+/+}, pero para F13714 la curva de respuesta a la dosis para el efecto pro sexual en ratas SERT^{-/-} se desplazó hacia la derecha en comparación con las ratas SERT^{+/+}. Se conoce que la estimulación de los receptores 5-HT_{1A} por agonistas no selectivos del receptor 5-HT_{1A} como 8-OH-DPAT, flesinoxan, buspirona y otros, tienen efectos pro sexuales en ratas salvajes (Olivier et al., 1999; Snoeren et al., 2014 para revisión), pero hasta ahora no hay estudios que evalúen las contribuciones selectivas de los autorreceptores o heterorreceptores 5-HT_{1A} (o ambos). Un tercer compuesto evaluado fue S15535, un agonista del receptor 5-HT_{1A} selectivo al autorreceptor y un antagonista selectivo del heterorreceptor 5-HT_{1A}, que no tuvo ningún efecto sobre el comportamiento sexual masculino de las ratas SERT^{+/+} y SERT^{-/-}, concluyendo que este compuesto en particular se comporta principalmente como un ligando silencioso del receptor 5-HT_{1A} en el comportamiento sexual de las ratas macho.

Previamente se demostró que 8-OH-DPAT, un agonista no selectivo del heterorreceptor y del autorreceptor 5-HT_{1A} (Larsson et al., 1990), posee efectos pro sexuales muy fuertes dependientes de la dosis (Chan et al., 2011; Mos et al., 1991). Estos efectos pueden ser antagonizados por el antagonista del receptor 5-HT_{1A} WAY100,635, que es un compuesto silencioso en animales de tipo salvaje (de Jong & Neumann, 2015). El 8-OH-DPAT tiene efectos pro sexuales en ratas macho

SERT^{-/-} (Chan et al., 2011), aunque la curva dosis-respuesta encontrada se desplazó hacia la derecha en comparación con las ratas SERT^{+/+}, como nuestros resultados con F13714. Estos resultados hacen que la explicación en términos del mecanismo del auto y heterorreceptor 5-HT_{1A} sea algo difícil de interpretar. Aunque es posible que el agonista preferencial del receptor 5-HT_{1A} postsináptico F15599 muestre alguna actividad agonista presináptica del autorreceptor, este fármaco no parece ser la herramienta específica para activar selectivamente los heterorreceptores 5-HT_{1A} postsinápticos. La falta de efecto conductual de S15535 en los animales SERT^{+/+} o SERT^{-/-} también trae consigo interpretaciones problemáticas. Aunque los resultados de los experimentos realizados no arrojaron las respuestas que estábamos buscando en términos de la función y los mecanismos de los receptores, en investigaciones previas realizadas en agresión (de Boer & Newman-Tancredi, 2016) con los mismos fármacos y en otros experimentos con animales SERT^{-/-} así como con otros agonistas del receptor 5-HT_{1A} (Olivier et al., 2008), encontramos que: 1) a pesar de que el comportamiento sexual y la agresión comparten la mayor parte de su sustrato neurobiológico (Jan G Veening et al., 2005), podría ser posible que diferentes grupos neuronales jueguen diferentes roles para la expresión de estos conjuntos particulares de comportamiento; 2) puede haber dos grupos de receptores 5-HT_{1A} regulados diferencialmente en ratas SERT^{-/-}; esto también se ha encontrado en la regulación autónoma de la temperatura corporal y el estrés (Olivier et al., 2008).

Conclusiones y perspectivas

En conclusión, encontramos que existe una representación anatómica y funcional de los órganos genitales externos en la corteza somatosensorial primaria (S1) de la rata macho, cuya área de activación funcional en la región de los genitales externos de S1 varía de acuerdo con la latencia de eyaculación, siendo mayor en ratas con latencias eyaculatorias cortas o intermedias. Esta es una

información muy valiosa para incorporar en la comprensión de las diferencias en la expresión del comportamiento sexual y la posible participación en el desarrollo o la aparición de disfunciones sexuales. El área de activación funcional debe tenerse especialmente en cuenta y utilizarse en posibles nuevos desarrollos de terapias conductuales que involucren información sensorial para tratar la eyaculación precoz y tardía. El modelo animal propuesto y estudiado para examinar los efectos crónicos de la exposición a los ISRS en el comportamiento sexual se ha validado aún más. Los animales SERT^{+/-} muestran comportamientos sexuales similares a los animales SERT^{+/+} y, por lo tanto, no pueden usarse como modelo para la exposición crónica a los ISRS. Por otro lado, las ratas macho SERT^{-/-} tienen un patrón sexual muy bien definido y estable que nos permite estudiar los efectos de la exposición a niveles de 5-HT extracelulares en el cerebro durante toda la vida en el comportamiento sexual.

De los diferentes fármacos estudiados, tenemos que concluir que aún necesitamos realizar muchos estudios para desarrollar un medicamento que se pueda recetar como un tratamiento “a demanda” para la eyaculación precoz. Por ejemplo, el tramadol puede ser de uso agudo, pero la dosis necesaria puede ser muy alta o sus efectos secundarios (adicción) son problemáticos. Algunos agonistas preferenciales del receptor 5-HT_{1A} podrían ser útiles para el tratamiento “a demanda” para mejorar la capacidad de un hombre de desempeñarse mejor sexualmente, pero los mecanismos subyacentes a tales efectos necesitan más investigaciones.

A pesar de que en el campo de la salud sexual ha realizado una extensa investigación durante las últimas décadas, muchas preguntas permanecen sin respuestas, especialmente las relacionadas con disfunciones sexuales. Aunque se conoce mucho sobre los mecanismos neurobiológicos implicados en la expresión normal de la conducta sexual, la comunidad científica no ha podido identificar completamente la etiología de las anormalidades en el campo de la investigación en

humanos. Es necesario dedicar más investigación al tema de la disfunción sexual en hombres y mujeres (aunque esta tesis se centró en el hombre) y tratar de diseñar y seguir realizando experimentos que puedan arrojar algo de luz sobre los mecanismos y problemas (desconocidos) en el campo de rendimiento sexual.

Tabla 1. Tabla de resultados principales de los capítulos experimentales (2- 6)

<i>Resultados capítulo 2</i>							
Sujetos	Estimulo	Fenotipo	Latencia de eyaculación	% de representación en SI con respecto al tronco			
Ratas macho Wistar wildtype	Estimulación táctil en área genital con brocha	L.C.	Corta (510±38s)	16%			
		L.I.	Intermedia (830±34s)	16%			
		L.L.	Lenta (1507±60s)	8%			
		N.E.	No eyaculadores (>1800s)	7%			
		N.C.	No copuladores	4%			
<i>Resultados capítulo 3</i>							
Sujetos	Entrenamiento	Genotipo	Conducta Sexual				
Ratas macho Wistar SERT ^{+/+} , SERT ^{+/-} y SERT ^{-/-}	Pruebas de entrenamiento sexual	SERT ^{+/+}	Despliegue normal de conducta sexual				
		SERT ^{+/-}	Despliegue normal de conducta sexual				
		SERT ^{-/-}	Despliegue anormal de conducta sexual				
<i>Resultados capítulo 4</i>							
Sujeto/ Fármaco	Mecanismo	Conductas					
Ratas macho Wistar wildtype		E	M	I	LE	LM	LI
Tramadol (T)	ISRS, agonista receptor μ , IRN	↓	↓	↓	↑	↑	↑
Naloxona (N)	antagonista receptor μ	-	-	-	-	-	-
WAY100,635	Antagonista receptor 5-HT _{1A}	-	-	-	-	-	-
Paroxetina (P)	ISRS	-	-	-	-	-	-
T+N vs T		↑	-	↑	↑	↑	↑
WAY+P		↓	↓	↓	↑	↑	↑

Resultados capítulo 5								
Fármaco	Mecanismo	Genotipo	Conductas					
			E	M	I	LE	LM	LI
Tramadol (T)	ISRS, agonista receptor μ , IRN	SERT ^{+/+}	↓	↓	↓	↑	↑	↑
		SERT ^{-/-}	↓	↓	↓	↑	↑	↑
Naloxona (N)	antagonista receptor μ	SERT ^{+/+}	-	-	-	-	-	-
		SERT ^{-/-}	↓	-	-	-	-	-
WAY100,635	Antagonista receptor 5-HT _{1A}	SERT ^{+/+}	-	-	-	-	-	-
		SERT ^{-/-}	↓	↓	↓	↑	↑	↑
T+WAY vs T		SERT ^{+/+}	↓	↓	↓	↑	↑	↑
		SERT ^{-/-}	↓	↓	↓	↑	↑	↑
T+N vs T		SERT ^{+/+}	↓	↓	↓	↑	↑	↑
		SERT ^{-/-}	-	↓	↓	-	-	-
T+WAY+N vs T		SERT ^{+/+}	↓	↓	↓	↑	↑	↑
		SERT ^{-/-}	↓	↓	↓	↑	↑	↑
Resultados capítulo 6								
Fármaco	Mecanismo	Genotipo	Conductas					
			E	M	I	LE	LM	LI
F13714	Agonista receptor 5-HT _{1A} (autorreceptor)	SERT ^{+/+}	↑	↓	↓	↑	-	↑↓
		SERT ^{-/-}	↑	↓	-	-	↑	↓
F15599	Agonista receptor 5-HT _{1A} (hetero receptor)	SERT ^{+/+}	↑	-	↓	-	-	-
		SERT ^{-/-}	↑	-	↓	-	-	-
S15535	Agonista receptor 5-HT _{1A} (autorreceptor) Antagonista receptor 5-HT _{1A} (hetero receptor)	SERT ^{+/+}	-	↓	-	-	-	-
		SERT ^{-/-}	-	↓	-	-	-	-

Tabla que condensa los resultados principales de los capítulos experimentales. Para mayores detalles sobre posibles mecanismos involucrados referir a la sección de discusión de cada capítulo.

Referencias

- Ågmo, A. (1997). Male rat sexual behavior. *Brain Research. Brain Research Protocols*, *1*(2), 203–209. [https://doi.org/10.1016/S1385-299X\(96\)00036-0](https://doi.org/10.1016/S1385-299X(96)00036-0)
- Ågmo, A. (1999). Sexual motivation--an inquiry into events determining the occurrence of sexual behavior. *Behavioural Brain Research*, *105*(1), 129–150. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(99\)00088-1](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(99)00088-1)
- Ågmo, A., & Paredes, R. (1988). Opioids and sexual behavior in the male rat. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *30*(4), 1021–1034. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(88\)90135-9](https://doi.org/10.1016/0091-3057(88)90135-9)
- Ågmo, Anders. (2003). Unconditioned Sexual Incentive Motivation in the Male Norway Rat (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology*, *117*(1), 3–14. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.117.1.3>
- Ågmo, Anders. (2011). On the intricate relationship between sexual motivation and arousal. *Hormones and Behavior*, *59*(5), 681–688. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.08.013>
- Ågmo, Anders. (2014). Animal models of female sexual dysfunction: Basic considerations on drugs, arousal, motivation and behavior. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *121*, 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.10.003>
- Ahlenius, S, Larsson, K., Svensson, L., Hjorth, S., Carlsson, A., Lindberg, P., ... Nilsson, J. L. G. (1981). Effects of a new type of 5-HT receptor agonist on male rat sexual behavior. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *15*(5), 785–792. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(81\)90023-X](https://doi.org/10.1016/0091-3057(81)90023-X)
- Ahlenius, Sven, & Larsson, K. (1985). Antagonism by lisuride and 8-OH-DPAT of 5-HTP-induced prolongation of the performance of male rat sexual behavior. *European Journal of Pharmacology*, *110*(3), 379–381. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(85\)90568-0](https://doi.org/10.1016/0014-2999(85)90568-0)
- Alexander, B. M., Perkins, A., Van Kirk, E. A., Moss, G. E., & Fitzgerald, J. A. (1993). Hypothalamic and hypophyseal receptors for estradiol in high and low sexually performing rams. *Hormones and Behavior*, *27*(3), 296–307. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8225254>
- Alexander, B. M., Stellflug, J. N., Rose, J. D., Fitzgerald, J. A., & Moss, G. E. (1999). Behavior and endocrine changes in high-performing, low-performing, and male-oriented domestic rams following exposure to rams and ewes in estrus when copulation is precluded. *Journal of Animal Science*, *77*(7), 1869. <https://doi.org/10.2527/1999.7771869x>
- Althof, S. E. (2006). Prevalence, Characteristics and Implications of Premature Ejaculation/Rapid Ejaculation. *The Journal of Urology*, *175*(3), 842–848. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)00341-1](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)00341-1)
- Althof, S. E., Abdo, C. H. N., Dean, J., Hackett, G., McCabe, M., McMahon, C. G., ... International Society for Sexual Medicine. (2010). International Society for Sexual Medicine's Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Premature Ejaculation. *The*

Journal of Sexual Medicine, 7(9), 2947–2969. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2010.01975.x>

- Altieri, S. C., Garcia-Garcia, A. L., Leonardo, E. D., & Andrews, A. M. (2013, January 16). Rethinking 5-HT1A receptors: Emerging modes of inhibitory feedback of relevance to emotion-related behavior. *ACS Chemical Neuroscience*. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/cn3002174>
- American Psychiatric Association. (2014). *Handboek voor de classificatie van psychische stoornissen (DSM-5)*. Uitgeverij Boom. Retrieved from <https://www.dsm-5.nl/>
- Andersson, G., & Larsson, K. (1994). Effects of FG 5893, a new compound with 5-HT1A receptor agonistic and 5-HT2 receptor antagonistic properties, on male rat sexual behavior. *European Journal of Pharmacology*, 255(1–3), 131–137. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(94\)90091-4](https://doi.org/10.1016/0014-2999(94)90091-4)
- Antaramian, A., González-Gallardo, A., García-Ugalde, C., Portillo, W., & Paredes, R. G. (2015). Steroid Receptors and Aromatase Gene Expression in Different Brain Areas of Copulating and Sexually Sluggish Male Rats. *The Journal of Sexual Medicine*, 12(12), 2267–2275. <https://doi.org/10.1111/jsm.13073>
- Assié, M. B., Lomenech, H., Ravailhe, V., Faucillon, V., & Newman-Tancredi, A. (2006). Rapid desensitization of somatodendritic 5-HT 1A receptors by chronic administration of the high-efficacy 5-HT 1A agonist, F13714: A microdialysis study in the rat. *British Journal of Pharmacology*, 149(2), 170–178. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706859>
- Assié, Marie Bernadette, Bardin, L., Auclair, A. L., Carilla-Durand, E., Depoortère, R., Koek, W., ... Newman-Tancredi, A. (2010). F15599, a highly selective post-synaptic 5-HT1A receptor agonist: In-vivo profile in behavioural models of antidepressant and serotonergic activity. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 13(10), 1285–1298. <https://doi.org/10.1017/S1461145709991222>
- Avermann, M., Tomm, C., Mateo, C., Gerstner, W., & Petersen, C. C. H. (2012). Microcircuits of excitatory and inhibitory neurons in layer 2/3 of mouse barrel cortex. *Journal of Neurophysiology*, 107(11), 3116–3134. <https://doi.org/10.1152/jn.00917.2011>
- Balon, R. (2006). SSRI-Associated Sexual Dysfunction. *American Journal of Psychiatry*, 163(9), 1504–1509. <https://doi.org/10.1176/ajp.2006.163.9.1504>
- Bar-Or, D., Salottolo, K. M., Orlando, A., & Winkler, J. V. (2012). A randomized double-blind, placebo-controlled multicenter study to evaluate the efficacy and safety of two doses of the tramadol orally disintegrating tablet for the treatment of premature ejaculation within less than 2 minutes. *European Urology*, 61(4), 736–743. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2011.08.039>
- Becker, G., Bolbos, R., Costes, N., Redouté, J., Newman-Tancredi, A., & Zimmer, L. (2016). Selective serotonin 5-HT1A receptor biased agonists elicit distinct brain activation patterns: a pharmacMRI study. *Scientific Reports*, 6(1), 26633. <https://doi.org/10.1038/srep26633>
- Berendsen, H. H. G., Broekkamp, C. L. E., & Van Delft, A. M. L. (1990). Antagonism of 8-OH-DPAT-induced behaviour in rats. *European Journal of Pharmacology*, 187(1), 97–103.

[https://doi.org/10.1016/0014-2999\(90\)90344-6](https://doi.org/10.1016/0014-2999(90)90344-6)

- Bettocchi, C., Verze, P., Palumbo, F., Arcaniolo, D., & Mirone, V. (2008). Ejaculatory disorders: pathophysiology and management. *Nature Clinical Practice Urology*, 5(2), 93–103. <https://doi.org/10.1038/ncpuro1016>
- Beyer, C. E., Boikess, S., Luo, B., & Dawson, L. A. (2002). Comparison of the effects of antidepressants on norepinephrine and serotonin concentrations in the rat frontal cortex: an in-vivo microdialysis study. *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*, 16(4), 297–304. <https://doi.org/10.1177/026988110201600403>
- Beyer, C. E., & Cremers, T. I. F. H. (2008). Do selective serotonin reuptake inhibitors acutely increase frontal cortex levels of serotonin? *European Journal of Pharmacology*, 580(3), 350–354. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.11.028>
- Bhasin, S., & Benson, G. S. (2006). Male sexual function. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, (13), 1173–1194. <https://doi.org/10.1016/B978-012515400-0/50029-4>
- Bijlsma, E. Y., Chan, J. S. W., Olivier, B., Veening, J. G., Millan, M. J., Waldinger, M. D., & Oosting, R. S. (2014, June 1). Sexual side effects of serotonergic antidepressants: Mediated by inhibition of serotonin on central dopamine release? *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.10.004>
- Blier, P., & De Montigny, C. (1998). Possible serotonergic mechanisms underlying the antidepressant and anti-obsessive-compulsive disorder responses. *Biological Psychiatry*, 44(5), 313–323. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(98\)00114-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(98)00114-0)
- Bloms-Funke, P., Dremencov, E., Cremers, T. I. F. H., & Tzschentke, T. M. (2011). Tramadol increases extracellular levels of serotonin and noradrenaline as measured by in vivo microdialysis in the ventral hippocampus of freely-moving rats. *Neuroscience Letters*, 490(3), 191–195. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.12.049>
- Bortolato, M., Chen, K., & Shih, J. C. (2010). The Degradation of Serotonin: Role of MAO. In *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 21, pp. 203–218). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1569-7339\(10\)70079-5](https://doi.org/10.1016/S1569-7339(10)70079-5)
- Bosker, F. J., Klompmakers, A. A., & Westenberg, H. G. (1995). Effects of single and repeated oral administration of fluvoxamine on extracellular serotonin in the median raphe nucleus and dorsal hippocampus of the rat. *Neuropharmacology*, 34(5), 501–508. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7566484>
- Boureau, Y. L., & Dayan, P. (2011). Opponency revisited: Competition and cooperation between dopamine and serotonin. *Neuropsychopharmacology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.151>
- Buonomano, D. V., & Merzenich, M. M. (1998). Cortical plasticity: from synapses to maps. *Annual Review of Neuroscience*, 21(149), 149–186. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.21.1.149>
- Caldarone BJ, Paterson NE, Zhou J, Brunner D, Kozikowski AP, Westphal KG, Korte-Bouws GA, Prins J, Korte SM, Olivier B, G. A. (2010). The Novel Triple Reuptake Inhibitor JZAD-IV-22 Exhibits an Antidepressant Pharmacological Profile without Locomotor Stimulant or Sensitization Properties. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 335(3),

762–770. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.174011>

- Capello, C. F., Bourke, C. H., Ritchie, J. C., Stowe, Z. N., Newport, D. J., Nemeroff, A., & Owens, M. J. (2011). Serotonin Transporter Occupancy in Rats Exposed to Serotonin Reuptake Inhibitors In Utero or via Breast Milk. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *339*(1), 275–285. <https://doi.org/10.1124/jpet.111.183855>
- Carli, M., Balducci, C., Millan, M. J., Bonalumi, P., & Samanin, R. (1999). S 15535, a benzodioxopiperazine acting as presynaptic agonist and postsynaptic 5-HT(1A) receptor antagonist, prevents the impairment of spatial learning caused by intrahippocampal scopolamine. *British Journal of Pharmacology*, *128*(6), 1207–1214. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702915>
- Cazala, F., Vienney, N., & Stoléru, S. (2015). The cortical sensory representation of genitalia in women and men: a systematic review. *Socioaffective Neuroscience & Psychology*, *5*(1), 26428. <https://doi.org/10.3402/snp.v5.26428>
- Chan, J. S. W., Olivier, B., de Jong, T. R., Snoeren, E. M. S., Kooijman, E., van Hasselt, F. N., ... Oosting, R. S. (2008). Translational research into sexual disorders: pharmacology and genomics. *European Journal of Pharmacology*, *585*(2–3), 426–435. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.02.098>
- Chan, J. S. W., Snoeren, E. M. S., Cuppen, E., Waldinger, M. D., Olivier, B., & Oosting, R. S. (2011). The serotonin transporter plays an important role in male sexual behavior: a study in serotonin transporter knockout rats. *J. Sex. Med.*, *8*(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.), 97–108. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2010.01961.x>
- Chan, J. S. W., Waldinger, M. D., Olivier, B., & Oosting, R. S. (2010, October). Drug-induced sexual dysfunction in rats. *Current Protocols in Neuroscience*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0934s53>
- Charnay, Yves; Léger, L. (2010). Pharmacological aspects: Brain serotonergic circuitries. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *12*(4), 471–487. Retrieved from <https://www.semanticscholar.org/paper/Brain-serotonergic-circuitries-Charnay-Léger/899c19b973a0966bdc87cfef4a1c32e08261eae0>
- Contreras, J. L., & Agmo, A. (1993). Sensory control of the male rat's copulatory thrusting patterns. *Behavioral and Neural Biology*, *60*(3), 234–240. [https://doi.org/10.1016/0163-1047\(93\)90447-P](https://doi.org/10.1016/0163-1047(93)90447-P)
- Coolen, L M, Allard, J., Truitt, W. A., & McKenna, K. E. (2004). Central regulation of ejaculation. *Physiology & Behavior*, *83*(2), 203–215. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.08.023>
- Coolen, L M, Peters, H. J., & Veening, J. G. (1998). Anatomical interrelationships of the medial preoptic area and other brain regions activated following male sexual behavior: a combined fos and tract-tracing study. *The Journal of Comparative Neurology*, *397*(3), 421–35. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19980803\)397:3<421::AID-CNE8>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19980803)397:3<421::AID-CNE8>3.0.CO;2-4)
- Coolen, Lique M, & Hull, E. M. (2004). Male sexual function. *Physiology & Behavior*, *83*(13), 175–176. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.09.018>

- Corona, G., Jannini, E. a, Vignozzi, L., Rastrelli, G., & Maggi, M. (2012). The hormonal control of ejaculation. *Nature Reviews. Urology*, 9(9), 508–519. <https://doi.org/10.1038/nrrol.2012.147>
- Dalley, J. W., Cardinal, R. N., & Robbins, T. W. (2004). Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 28(7), 771–784. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.09.006>
- Day, T. A., Blessing, W., & Willoughby, J. O. (1980). Noradrenergic and dopaminergic projections to the medial preoptic area of the rat. A combined horseradish peroxidase/catecholamine fluorescence study. *Brain Research*, 193(2), 543–548. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(80\)90185-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(80)90185-7)
- de Boer, S F, Lesourd, M., Mocaer, E., & Koolhaas, J. M. (1999). Selective antiaggressive effects of alnespirone in resident-intruder test are mediated via 5-hydroxytryptamine1A receptors: A comparative pharmacological study with 8-hydroxy-2-dipropylaminotetralin, ipsapirone, buspirone, eltoprazine, and WAY-100635. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 288(3), 1125–1133. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10027850>
- de Boer, Sietse F., Lesourd, M., Mocaër, E., & Koolhaas, J. M. (2000). Somatodendritic 5-HT(1A) autoreceptors mediate the anti-aggressive actions of 5-HT(1A) receptor agonists in rats: An ethopharmacological study with S-15535, alnespirone, and WAY-100635. *Neuropsychopharmacology*, 23(1), 20–33. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(00\)00092-0](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(00)00092-0)
- de Boer, Sietse F., & Newman-Tancredi, A. (2016). Anti-aggressive effects of the selective high-efficacy “biased” 5-HT1A receptor agonists F15599 and F13714 in male WTG rats. *Psychopharmacology*, 233(6), 937–947. <https://doi.org/10.1007/s00213-015-4173-x>
- De Gasperín-Estrada, G. P., Camacho, F. J., & Paredes, R. G. (2008). Olfactory discrimination and incentive value of non copulating and sexually sluggish male rats. *Physiology & Behavior*, 93(4–5), 742–747. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.11.027>
- de Jong, T., Pattij, T., Veening, J. G., Dederen, P. J. W. C., Waldinger, M. D., Cools, A. R., & Olivier, B. (2005). Effects of chronic paroxetine pretreatment on (±)-8-hydroxy-2-(di-n-propyl-amino)tetralin induced c-fos expression following sexual behavior. *Neuroscience*, 134(4), 1351–1361. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.05.012>
- de Jong, T. R., & Neumann, I. D. (2015). Moderate Role of Oxytocin in the Pro-Ejaculatory Effect of the 5-HT1A Receptor Agonist 8-OH-DPAT. *Journal of Sexual Medicine*, 12(1), 17–28. <https://doi.org/10.1111/jsm.12742>
- de Jong, T. R., Pattij, T., Veening, J. G., Dederen, P. J. W. C., Waldinger, M. D., Cools, A. R., & Olivier, B. (2005). Citalopram combined with WAY 100635 inhibits ejaculation and ejaculation-related Fos immunoreactivity. *European Journal of Pharmacology*, 509(1), 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.12.024>
- de Jong, T. R., Pattij, T., Veening, J. G., Waldinger, M. D., Cools, A. R., & Olivier, B. (2005). Effects of chronic selective serotonin reuptake inhibitors on 8-OH-DPAT-induced facilitation of ejaculation in rats: comparison of fluvoxamine and paroxetine. *Psychopharmacology*, 179(2), 509–515. <https://doi.org/10.1007/s00213-005-2186-6>

- de Jong, T. R., Veening, J. G., Waldinger, M. D., Cools, A. R., & Olivier, B. (2006). Serotonin and the neurobiology of the ejaculatory threshold. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 30(7), 893–907. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2006.01.001>
- deGroat, W. C., & Booth, A. M. (1980). Physiology of Male Sexual Function. *Annals of Internal Medicine*, 92(2_Part_2), 329. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-92-2-329>
- Dekeyne, A., Gobert, A., Iob, L., Cistarelli, L., Melon, C., & Millan, M. J. (2001). Discriminative stimulus properties of the selective norepinephrine reuptake inhibitor, reboxetine, in rats. *Psychopharmacology*, 158(2), 213–218. <https://doi.org/10.1007/s002130100895>
- Derdikman, D., Hildesheim, R., Ahissar, E., Arieli, A., & Grinvald, A. (2003). Imaging spatiotemporal dynamics of surround inhibition in the barrels somatosensory cortex. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(8), 3100–3105. <https://doi.org/23/8/3100> [pii]
- Dewsbury, D A, Oglesby, J. M., Shea, S. L., & Connor, J. L. (1979). Inbreeding and copulatory behavior in house mice: a further consideration. *Behavior Genetics*, 9(3), 151–163. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/496796>
- Dewsbury, Donald A., & Hartung, T. G. (1980). Copulatory behaviour and differential reproduction of laboratory rats in a two-male, one-female competitive situation. *Animal Behaviour*, 28(1), 95–102. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(80\)80012-1](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(80)80012-1)
- Dominguez, J. M., & Hull, E. M. (2005). Dopamine, the medial preoptic area, and male sexual behavior. *Physiology & Behavior*, 86(3), 356–368. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.08.006>
- Eassa, B. I., & El-Shazly, M. A. (2013). Safety and efficacy of tramadol hydrochloride on treatment of premature ejaculation. *Asian Journal of Andrology*, 15(1), 138–142. <https://doi.org/10.1038/aja.2012.96>
- Edwards, D. A., & Burge, K. G. (1973). Olfactory control of the sexual behavior of male and female mice. *Physiology and Behavior*, 11(6), 867–872. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(73\)90282-5](https://doi.org/10.1016/0031-9384(73)90282-5)
- El Mansari, M., & Blier, P. (2005). Responsiveness of 5-HT1A and 5-HT2 receptors in the rat orbitofrontal cortex after long-term serotonin reuptake inhibition. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 30(4), 268–274. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16049570>
- Ellingsen, E., & Ågmo, A. (2004). Sexual-incentive motivation and paced sexual behavior in female rats after treatment with drugs modifying dopaminergic neurotransmission. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 77(3), 431–445. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2003.12.008>
- Esquivel-Franco, D. C., Olivier, B., Waldinger, M. D., Gutiérrez-Ospina, G., & Olivier, J. D. A. (2018). Tramadol's inhibitory effects on sexual behavior: Pharmacological studies in serotonin transporter knockout rats. *Frontiers in Pharmacology*, 9(JUN), 676. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00676>
- Ferguson, J. M. (2001). SSRI Antidepressant Medications: Adverse Effects and Tolerability.

Primary Care Companion to the Journal of Clinical Psychiatry, 3(1), 22–27.
<https://doi.org/10.4088/PCC.v03n0105>

- Fernandez-Guasti, A., Escalante, A. L., Ahlenius, S., Hillegaart, V., & Larsson, K. (1992). Stimulation of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2B} receptors in brain regions and its effects on male rat sexual behaviour. *European Journal of Pharmacology*, 210(1992), 121–129. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(92\)90662-N](https://doi.org/10.1016/0014-2999(92)90662-N)
- Ferreira-nuño, A., Fernández-Soto, C., Olayo-Lortia, J., Ramirez-Carretero, R., Paredes, R. G., Velázquez-Moctezuma, J., & Morales-Otal, A. (2010). Copulatory pattern of male rats in a multiple partner choice arena. *Journal of Sexual Medicine*, 7(12), 3845–3856. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2010.01746.x>
- Filip, M., Wydra, K., Yalcin Inan, S., Dziedzicka-Wasylewska, M., & Przegaliński, E. (2004). Opioid and monoamine systems mediate the discriminative stimulus of tramadol in rats. *European Journal of Pharmacology*, 498(1–3), 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.07.090>
- Filipkowski, R. K., Rydz, M., Berdel, B., Morys, J., & Kaczmarek, L. (2000). Tactile Experience Induces c-fos Expression in Rat Barrel Cortex. *Learning & Memory*, 7(2), 116–122. <https://doi.org/10.1101/lm.7.2.116>
- Frink, M. C., Hennies, H. H., Englberger, W., Haurand, M., & Wilffert, B. (1996). Influence of tramadol on neurotransmitter systems of the rat brain. *Arzneimittel-Forschung*, 46(11), 1029–1036. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8955860>
- Garcia-Garcia, A. L., Meng, Q., Canetta, S., Gardier, A. M., Guiard, B. P., Kellendonk, C., ... Leonardo, E. D. (2017). Serotonin Signaling through Prefrontal Cortex 5-HT_{1A} Receptors during Adolescence Can Determine Baseline Mood-Related Behaviors. *Cell Reports*, 18(5), 1144–1156. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.021>
- Garcia-Garcia, A. L., Newman-Tancredi, A., & Leonardo, E. D. (2014, February 12). P5-HT_{1A} receptors in mood and anxiety: Recent insights into autoreceptor versus heteroreceptor function. *Psychopharmacology*. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3389-x>
- Georgiadis, J. R. (2012). Doing it ... wild? On the role of the cerebral cortex in human sexual activity. *Socioaffective Neuroscience & Psychology*, 2, 17337. <https://doi.org/10.3402/snp.v2i0.17337>
- Georgiadis, J. R., & Holstege, G. (2005). Human brain activation during sexual stimulation of the penis. *Journal of Comparative Neurology*, 493(1), 33–38. <https://doi.org/10.1002/cne.20735>
- Gessa, G. L., Paglietti, E., & Quarantotti, B. P. (1979). Induction of copulatory behavior in sexually inactive rats by naloxone. *Science (New York, N.Y.)*, 204(4389), 203–205. <https://doi.org/10.2307/1747606>
- Gothert, M., & Weinheimer, G. (2004). Extracellular 5-hydroxytryptamine inhibits 5-hydroxytryptamine release from rat brain cortex slices. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 310(1), 93–96. <https://doi.org/10.1007/bf00499879>
- Graf, H., Walter, M., Metzger, C. D., & Ablter, B. (2014). Antidepressant-related sexual dysfunction - Perspectives from neuroimaging. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*,

121, 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.12.003>

- Griffen, T. C., & Maffei, A. (2014). GABAergic synapses: their plasticity and role in sensory cortex. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(March), 91. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00091>
- Hall, F. S., Schwarzbaum, J. M., Perona, M. T. G., Templin, J. S., Caron, M. G., Lesch, K. P., ... Uhl, G. R. (2011). A greater role for the norepinephrine transporter than the serotonin transporter in murine nociception. *Neuroscience*, 175, 315–327. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.11.057>
- Hazari, P. P., Pandey, A., Chaturvedi, S., & Mishra, A. K. (2017, November 15). New Trends and Current Status of Positron-Emission Tomography and Single-Photon-Emission Computerized Tomography Radioligands for Neuronal Serotonin Receptors and Serotonin Transporter. *Bioconjugate Chemistry*. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00243>
- Heijkoop, R., Huijgens, P. T., & Snoeren, E. M. (2018). Assessment of sexual behavior in rats: The potentials and pitfalls. *Behavioural Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.10.029>
- Hennies, H. H., Friderichs, E., & Schneider, J. (1988). Receptor binding, analgesic and antitussive potency of tramadol and other selected opioids. *Arzneimittel-Forschung*, 38(7), 877–880. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2849950>
- Hevner, R. F., Liu, S., & Wong-Riley, M. T. T. (1995). A metabolic map of cytochrome oxidase in the rat brain: Histochemical, densitometric and biochemical studies. *Neuroscience*, 65(2), 313–342. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)00514-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)00514-6)
- Higgins, A., Nash, M., & Lynch, A. M. (2010, September). Antidepressant-associated sexual dysfunction: Impact, effects, and treatment. *Drug, Healthcare and Patient Safety*. Dove Press. <https://doi.org/10.2147/DHPS.S7634>
- Hillegaart, V., & Ahlenius, S. (1998). Facilitation and inhibition of male rat ejaculatory behaviour by the respective 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor agonists 8-OH-DPAT and anpirtoline, as evidenced by use of the corresponding new and selective receptor antagonists NAD-299 and NAS-181. *British Journal of Pharmacology*, 125, 1733–1743. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702239>
- Hirschfeld, R. M. A. (2003). Long-term side effects of SSRIs: sexual dysfunction and weight gain. *The Journal of Clinical Psychiatry*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14700451>
- Homberg, J. R., Olivier, J. D. A., Smits, B. M. G., Mul, J. D., Mudde, J., Verheul, M., ... Cuppen, E. (2007). Characterization of the serotonin transporter knockout rat: A selective change in the functioning of the serotonergic system. *Neuroscience*, 146(4), 1662–1676. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.03.030>
- Homberg, Judith R., De Boer, S. F., Raasø, H. S., Olivier, J. D. A., Verheul, M., Ronken, E., ... Cuppen, E. (2008). Adaptations in pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptor function and cocaine supersensitivity in serotonin transporter knockout rats. *Psychopharmacology*, 200(3),

367–380. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1212-x>

- Homberg, Judith R, van den Bos, R., den Heijer, E., Suer, R., & Cuppen, E. (2008). Serotonin transporter dosage modulates long-term decision-making in rat and human. *Neuropharmacology*, *55*(1), 80–84. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.04.016>
- Hull, E., Meisel, R., & Sachs, B. (2002). Male Sexual Behavior. *Hormones, Brain, and Behavior*.
- Hull, E., Wood, R., & McKenna, K. (2006). Neurobiology of male sexual behavior. *Knobil and Neill's Physiology of ...*, 1729–1824. Retrieved from http://www.elaine-m-hull.com/publications/neurobio_male_sex_beh_chap.pdf
- Hull, E.M., & Dominguez, J. M. (2006). Getting his act together: Roles of glutamate, nitric oxide, and dopamine in the medial preoptic area. *Brain Research*, *1126*(1), 66–75. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.08.031>
- Hull, E M, Lorrain, D. S., Du, J., Matuszewich, L., Lumley, L. A., Putnam, S. K., & Moses, J. (1999). Hormone-neurotransmitter interactions in the control of sexual behavior. *Behavioural Brain Research*, *105*(1), 105-16. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(99\)00086-8](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(99)00086-8)
- Hull, Elaine M, & Dominguez, J. M. (2007). Sexual behavior in male rodents. *Hormones and Behavior*, *52*(1), 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.03.030>
- Hull, Elaine M, Muschamp, J. W., & Sato, S. (2004). Dopamine and serotonin: influences on male sexual behavior. *Physiology & Behavior*, *83*(2), 291–307. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.08.018>
- Jacobs, B. L., & Azmitia, E. C. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiological Reviews*, *72*(1), 165–229. <https://doi.org/10.1152/physrev.1992.72.1.165>
- Jannini, E. A., Simonelli, C., & Lenzi, A. (2002). Disorders of ejaculation. *Journal of Endocrinological Investigation*, *25*(11), 1006–1019. <https://doi.org/10.1007/BF03344077>
- Jannini, Emmanuele A., & Lenzi, A. (2005). Ejaculatory disorders: epidemiology and current approaches to definition, classification and subtyping. *World Journal of Urology*, *23*(2), 68–75. <https://doi.org/10.1007/s00345-004-0486-9>
- Jannini, Emmanuele A, & Lenzi, A. (2005). Epidemiology of premature ejaculation. *Current Opinion in Urology*, *15*(6), 399–403. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16205491>
- Jastrzębska-Więsek, M., Partyka, A., Rychtyk, J., Śniecikowska, J., Kołaczowski, M., Wesółowska, A., ... Newman-Tancredi, A. (2018). Activity of Serotonin 5-HT1A Receptor Biased Agonists in Rat: Anxiolytic and Antidepressant-like properties. *ACS Chemical Neuroscience*, *9*(5), 1040–1050. <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.7b00443>
- Kakigi, R., Hoshiyama, M., Shimojo, M., Naka, D., Itomi, K., Nakamura, A., ... Lam, K. (2000). The somatosensory evoked magnetic fields. *Progress in Neurobiology*, *61*(5), 495–523. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(99\)00063-5](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(99)00063-5)
- Keel, C., Dorsey, P., Acker, W., & Hellstrom, W. (2010). New Concepts in the Diagnosis and Treatment of Premature Ejaculation. *Current Urology Reports*, 1–7.

<https://doi.org/10.1007/s11934-010-0144-2>

- Kell, C. A. (2005). The Sensory Cortical Representation of the Human Penis: Revisiting Somatotopy in the Male Homunculus. *Journal of Neuroscience*, 25(25), 5984–5987. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0712-05.2005>
- Kim, S. W., & Paick, J. S. (1999). Short-term analysis of the effects of as needed use of sertraline at 5 pm for the treatment of premature ejaculation. *Urology*, 54(3), 544–547. [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(99\)00187-9](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(99)00187-9)
- Koek, W., Vacher, B., Cosi, C., Assié, M. B., Patoiseau, J. F., Pauwels, P. J., & Colpaert, F. C. (2001). 5-HT1A receptor activation and antidepressant-like effects: F 13714 has high efficacy and marked antidepressant potential. *European Journal of Pharmacology*, 420(2–3), 103–112. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(01\)01011-1](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(01)01011-1)
- Kohno, T., Moore, K. A., Baba, H., & Woolf, C. J. (2003). Peripheral nerve injury alters excitatory synaptic transmission in lamina II of the rat dorsal horn. *The Journal of Physiology*, 548(1), 131–138. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2003.00131.x>
- Kugaya, A., Seneca, N. M., Snyder, P. J., Williams, S. A., Malison, R. T., Baldwin, R. M., ... Innis, R. B. (2003). Changes in humanin, 5-HT_{1A} receptor, and dopamine transporter availabilities during chronic antidepressant administration. *Neuropsychopharmacology*, 28(2), 413–420. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300036>
- Lahon, K., Shetty, H., Paramel, A., & Sharma, G. (2011). Sexual dysfunction with the use of antidepressants in a tertiary care mental health setting - a retrospective case series. *Journal of Pharmacology and Therapeutics*, 2(2), 128. <https://doi.org/10.4103/0976-500x.81913>
- Larsson, K. (1956). *Conditioning and sexual behavior in the male albino rat*. (1st ed.). Stockholm: Almqvist & Wiksell.
- Larsson, K. (1961). Duration of facilitatory effects of ejaculation on sexual behavior in the male rat. *J Comp Physiol Psychol*, 54(1), 63–67. Retrieved from <http://psycnet.apa.org/journals/com/54/1/63.pdf>
- Larsson, L. G., Rényi, L., Ross, S. B., Svensson, B., & Ångeby-Möller, K. (1990). Different effects on the responses of functional pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors by repeated treatment of rats with the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT. *Neuropharmacology*, 29(2), 85–91. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(90\)90047-U](https://doi.org/10.1016/0028-3908(90)90047-U)
- Laumann, E. O., Nicolosi, A., Glasser, D. B., Paik, A., Gingell, C., Moreira, E., ... GSSAB Investigators' Group. (2005). Sexual problems among women and men aged 40–80 y: prevalence and correlates identified in the Global Study of Sexual Attitudes and Behaviors. *International Journal of Impotence Research*, 17(1), 39–57. <https://doi.org/10.1038/sj.ijir.3901250>
- Laumann, E. O., Paik, A., & Rosen, R. C. (1999). Sexual dysfunction in the United States: prevalence and predictors. *JAMA*, 281(6), 537–544. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10022110>
- Le Poul, E., Laaris, N., Doucet, E., Laporte, A. M., Hamon, M., & Lanfumey, L. (1995). Early

- desensitization of somato-dendritic 5-HT_{1A} autoreceptors in rats treated with fluoxetine or paroxetine. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 352(2), 141–148. <https://doi.org/10.1007/BF00176767>
- Lehmann, K., Steinecke, A., & Bolz, J. (2012). GABA through the ages: Regulation of cortical function and plasticity by inhibitory interneurons. *Neural Plasticity*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/892784>
- Lenschow, C., Copley, S., Gardiner, J. M., Talbot, Z. N., Vitenzon, A., & Brecht, M. (2015). Sexually Monomorphic Maps and Dimorphic Responses in Rat Genital Cortex. *Current Biology*, 26(1), 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.041>
- 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. <https://doi.org/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. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.07.010>
- Leranth, C., Maclusky, N. J., Shanabrough, M., & Naftolin, F. (1988). Catecholaminergic innervation of luteinizing hormone-releasing hormone and glutamic acid decarboxylase immunopositive neurons in the rat medial preoptic area: An electron-microscopic double immunostaining and degeneration study. *Neuroendocrinology*, 48(6), 591–602. <https://doi.org/10.1159/000125068>
- Li, Q., Wichems, C., Heils, A., Van De Kar, L. D., Lesch, K.-P., & Murphy, D. L. (1999). Reduction of 5-hydroxytryptamine (5-HT)_{1A}-mediated temperature and neuroendocrine responses and 5-HT_{1A} binding sites in 5-HT transporter knockout mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 291(3), 999–1007. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.1007/s12630-014-0282-y>
- Li, Y., Pehrson, A. L., Oosting, R. S., Gulinello, M., Olivier, B., & Sanchez, C. (2017). A study of time- and sex-dependent effects of vortioxetine on rat sexual behavior: Possible roles of direct receptor modulation. *Neuropharmacology*, 121, 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.04.017>
- Lladó-Pelfort, L., Santana, N., Ghisi, V., Artigas, F., & Celada, P. (2012). 5-HT_{1A} Receptor agonists enhance pyramidal cell firing in prefrontal cortex through a preferential action on GABA interneurons. *Cerebral Cortex*, 22(7), 1487–1497. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhr220>
- Lucio, R. A., Cruz, Y., Pichardo, A. I., Fuentes-Morales, M. R., Fuentes-Farias, A. L., Molina-Cerón, M. L., & Gutiérrez-Ospina, G. (2012). The physiology and ecophysiology of ejaculation. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. <https://doi.org/10.4090/juee.2008.v2n2.033040>
- Marek, G. J. (2010). Electrophysiology of Serotonin Receptors. In *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 21, pp. 163–182). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1569-7339\(10\)70077-1](https://doi.org/10.1016/S1569-7339(10)70077-1)

- Matthiesen, T., Wöhrmann, T., Coogan, T. P., & Uragg, H. (1998). The experimental toxicology of tramadol: an overview. *Toxicology Letters*, *95*(1), 63–71. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(98\)00023-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(98)00023-X)
- McClintock, M. K., & Anisko, J. J. (1982). Group mating among Norway rats I. Sex differences in the pattern and neuroendocrine consequences of copulation. *Animal Behaviour*, *30*(2), 398–409. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(82\)80051-1](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(82)80051-1)
- McIntosh, T. K., Vallano, M. L., & Barfield, R. J. (1980). Effects of morphine, beta-endorphin and naloxone on catecholamine levels and sexual behavior in the male rat. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *13*(3), 435–441. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(80\)90251-8](https://doi.org/10.1016/0091-3057(80)90251-8)
- McMahon, C. G., & Touma, K. (1999). Treatment of premature ejaculation with paroxetine hydrochloride as needed: 2 single-blind placebo controlled crossover studies. *Journal of Urology*, *161*(6), 1826–1830. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)68816-7](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)68816-7)
- Metz, M. E., Pryor, J. L., Nesvacil, L. J., Abuzzahab, F., & Koznar, J. (1997, March). Premature ejaculation: A psychophysiological review. *Journal of Sex and Marital Therapy*. <https://doi.org/10.1080/00926239708404413>
- Millan, M. J., Rivet, J. M., Canton, H., Lejeune, F., Gobert, A., Widdowson, P., ... Peglion, J. L. (1993). S 15535: a highly selective benzodioxopiperazine 5-HT_{1A} receptor ligand which acts as an agonist and an antagonist at presynaptic and postsynaptic sites respectively. *European Journal of Pharmacology*, *230*(1), 99–102. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(93\)90416-F](https://doi.org/10.1016/0014-2999(93)90416-F)
- Minami, K., Ogata, J., & Uezono, Y. (2015). What is the main mechanism of tramadol? *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *388*(10), 999–1007. <https://doi.org/10.1007/s00210-015-1167-5>
- Miotto, K., Cho, A. K., Khalil, M. A., Blanco, K., Sasaki, J. D., & Rawson, R. (2017, January). Trends in Tramadol: Pharmacology, Metabolism, and Misuse. *Anesthesia and Analgesia*. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000001683>
- Montejo-González, a L., Llorca, G., Izquierdo, J. a, Ledesma, a, Bousoño, M., Calcedo, a, ... Vicens, E. (1997). SSRI-induced sexual dysfunction: fluoxetine, paroxetine, sertraline, and fluvoxamine in a prospective, multicenter, and descriptive clinical study of 344 patients. *Journal of Sex & Marital Therapy*, *23*(3), 176–194. <https://doi.org/10.1080/00926239708403923>
- Moore, C. I., Nelson, S. B., & Sur, M. (1999). Dynamics of neuronal processing in rat somatosensory cortex. *Trends in Neurosciences*, *22*(11), 513–520. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(99\)01452-6](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(99)01452-6)
- Moore, C. L. (1992). The role of maternal stimulation in the development of sexual behavior and its neural basis. *Ann N Y Acad Sci*, *662*, 160–177. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1456637
- Morgan, J. I., & Curran, T. (1991). Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annual Review of Neuroscience*, *14*, 421–451. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.14.030191.002225>

- Mos, J., Van Logten, J., Bloetjes, K., & Olivier, B. (1991). The effects of idazoxan and 8-OH-DPAT on sexual behaviour and associated ultrasonic vocalizations in the rat. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *15*(4), 505–510. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(05\)80140-X](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(05)80140-X)
- Müller, C. P., Carey, R. J., Huston, J. P., & De Souza Silva, M. A. (2007, February 1). Serotonin and psychostimulant addiction: Focus on 5-HT1A-receptors. *Progress in Neurobiology*. Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.01.001>
- Murphy, A. Z., & Hoffman, G. E. (2001). Distribution of gonadal steroid receptor-containing neurons in the preoptic-periaqueductal gray-brainstem pathway: A potential circuit for the initiation of male sexual behavior. *Journal of Comparative Neurology*, *438*(2), 191–212. <https://doi.org/10.1002/cne.1309>
- Murphy, D. L., Lerner, A., Rudnick, G., & Lesch, K.-P. (2004). Serotonin Transporter: Gene, Genetic Disorders, and Pharmacogenetics. *Molecular Interventions*, *4*(2), 109–123. <https://doi.org/10.1124/mi.4.2.8>
- Myers, B. M., & Baum, M. J. (1979). Facilitation by opiate antagonists of sexual performance in the male rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *10*(4), 615–618. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(79\)90242-9](https://doi.org/10.1016/0091-3057(79)90242-9)
- Newman-Tancredi, A., Martel, J. C., Assié, M. B., Buritova, J., Laressergues, E., Cosi, C., ... Cussac, D. (2009). Signal transduction and functional selectivity of F15599, a preferential post-synaptic 5-HT1A receptor agonist. *British Journal of Pharmacology*, *156*(2), 338–353. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2008.00001.x>
- Newman-Tancredi, Adrian. (2011, April). Biased agonism at serotonin 5-HT1A receptors: Preferential postsynaptic activity for improved therapy of CNS disorders. *Neuropsychiatry*. <https://doi.org/10.2217/npv.11.12>
- Olayo-Lortia, J., Ferreira-Nuño, A., Velázquez-Moctezuma, J., & Morales-Otal, A. (2014). Further Definition on the Multiple Partner Choice Arena: A Potential Animal Model for the Study of Premature Ejaculation. *The Journal of Sexual Medicine*, *11*(10), 2428–2438. <https://doi.org/10.1111/jsm.12637>
- Olivier, J.D.A., Esquivel-Franco, D.C., Waldinger, M.D., Olivier, B. (2019). Serotonin and Sexual Behavior. In Mark Tricklebank & Eileen Daly (Eds.), *The Serotonin System History, Neuropharmacology, and Pathology* (1st editio, p. 400). ELSEVIER ACADEMIC Press. Retrieved from <https://mail.google.com/mail/u/1/#search/b.olivier%40uu.nl+serotonin?projector=1>
- Olivier, B, Chan, J. S. W., Pattij, T., de Jong, T. R., Oosting, R. S., Veening, J. G., & Waldinger, M. D. (2006). Psychopharmacology of male rat sexual behavior: modeling human sexual dysfunctions? *International Journal of Impotence Research*, *18*, S14–S23. <https://doi.org/10.1038/sj.ijir.3901330>
- Olivier, B, Soudijn, W., & van Wijngaarden, I. (1999). The 5-HT1A receptor and its ligands: structure and function. *Progress in Drug Research. Fortschritte Der Arzneimittelforschung. Progres Des Recherches Pharmaceutiques*, *52*, 103–165. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10396127>

- Olivier, Berend. (2015). Serotonin: A never-ending story. *European Journal of Pharmacology*, 753, 2–18. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.10.031>
- Olivier, Berend, Chan, J. S. W., Snoeren, E. M., Olivier, J. D. A., Veening, J. G., Vinkers, C. H., ... Oosting, R. S. (2011). Differences in sexual behaviour in male and female rodents: Role of serotonin. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 8, 15–36. https://doi.org/10.1007/7854_2010_116
- Olivier, J. D.A., Van Der Hart, M. G. C., Van Swelm, R. P. L., Dederen, P. J., Homberg, J. R., Cremers, T., ... Ellenbroek, B. A. (2008). A study in male and female 5-HT transporter knockout rats: An animal model for anxiety and depression disorders. *Neuroscience*, 152(3), 573–584. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.12.032>
- Olivier, J., Esquivel-Franco, D., Waldinger, M., & Olivier, B. (2017). Sexual dysfunction, depression and antidepressant: A translational approach. In *Sexual Dysfunction* (pp. 59–76). InTech. <https://doi.org/10.5772/711>
- Olivier, Jocelien D.A., Esquivel Franco, D. C., Oosting, R., Waldinger, M., Sarnyai, Z., & Olivier, B. (2017b). Tramadol: Effects on sexual behavior in male rats are mainly caused by its 5-HT reuptake blocking effects. *Neuropharmacology*, 116, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.11.020>
- Olivier, Jocelien D A, Cools, A. R., Deen, P. M. T., Olivier, B., & Ellenbroek, B. A. (2010). Blockade of dopamine, but not noradrenaline, transporters produces hyperthermia in rats that lack serotonin transporters. *European Journal of Pharmacology*, 629(1–3), 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.11.049>
- Olivier, Jocelien D A, Cools, A. R., Olivier, B., Homberg, J. R., Cuppen, E., & Ellenbroek, B. A. (2008). Stress-induced hyperthermia and basal body temperature are mediated by different 5-HT_{1A} receptor populations: A study in SERT knockout rats. *European Journal of Pharmacology*, 590(1–3), 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.06.008>
- Oosting, R. S., Chan, J. S., Olivier, B., Banerjee, P., Choi, Y. K., & Tarazi, F. (2016). Differential effects of vilazodone versus citalopram and paroxetine on sexual behaviors and serotonin transporter and receptors in male rats. *Psychopharmacology*, 233(6), 1025–1034. <https://doi.org/10.1007/s00213-015-4198-1>
- Oosting, R. S., Chan, J. S. W., Olivier, B., & Banerjee, P. (2016). Vilazodone does not inhibit sexual behavior in male rats in contrast to paroxetine: A role for 5-HT_{1A} receptors? *Neuropharmacology*, 107, 271–277. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.03.045>
- 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. *The European Journal of Neuroscience*, 22(3), 724–734. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04252.x>
- Pavlou, H. J., Lin, A. C., Neville, M. C., Nojima, T., Diao, F., Chen, B. E., ... Goodwin, S. F. (2016). Neural circuitry coordinating male copulation. *eLife*, 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.20713>
- Penfield, Wilder & Jasper, H. (1954). *Epilepsy and the functional anatomy of the human brain.*

Boston: Little Brown.

- Penfield, W., & Rasmussen, T. (1950). *The cerebral cortex of man; a clinical study of localization of function*.
- Porter, J. T., & Nieves, D. (2013). Presynaptic GABAB Receptor Modulate Thalamic Excitation of Inhibitory and Excitatory Neurons in the Mouse Barrel Cortex. *Journal of Neurophysiology*, 92(5), 2762–2770. <https://doi.org/10.1152/jn.00196.2004>. Presynaptic
- Portillo, W., Antonio-Cabrera, E., Camacho, F. J. J., Díaz, N. F. F., & Paredes, R. G. G. (2013). Behavioral characterization of non-copulating male mice. *Hormones and Behavior*, 64(1), 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.05.001>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2006.01513.x>
- Portillo, W., Díaz, N. F., Antonio Cabrera, E., Fernández-Guasti, A., & Paredes, R. G. (2006). Comparative analysis of immunoreactive cells for androgen receptors and oestrogen receptor a in copulating and non-copulating male rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 18, 168–176. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2005.01401.x>
- Portillo, Wendy, Díaz, N. F., Retana-Márquez, S., & Paredes, R. G. (2006). Olfactory, partner preference and Fos expression in the vomeronasal projection pathway of sexually sluggish male rats. *Physiology & Behavior*, 88(4–5), 389–397. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.04.023>
- Portillo, Wendy, & Paredes, R. G. (2003). Sexual and olfactory preference in noncopulating male rats. *Physiology and Behavior*, 80(1), 155–162. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(03\)00231-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(03)00231-2)
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2004.02.004>
- Purves, D. (1988). *Body and Brain. A Trophic Theory of Neural Connections*. Harvard University Press, Cambridge, MA. *Science (New York, N.Y.)*, 244(4907), 993. <https://doi.org/10.1126/science.244.4907.993>
- Purves, Dale, White, L. E., & Riddle, D. R. (1996). Is neural development darwinian? *Trends in Neurosciences*, 19(11), 460–464. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(96\)20038-4](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(96)20038-4)
- Riddle, D., Richards, A., Zsuppan, F., & Purves, D. (1992). Growth of the Rat Somatic Sensory during Postnatal Development Cortex and Its Constituent Parts, 12(September).
- Robaire, B., Hinton, B. T., & Orgebin-Crist, M.-C. (2006). *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (Vol. 1). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012515400-0/50000-2>
- Rojas-Corrales, M. O., Berrocoso, E., Gibert-Rahola, J., & Micó, J. A. (2002). Antidepressant-like effects of tramadol and other central analgesics with activity on monoamines reuptake, in helpless rats. *Life Sciences*, 72(2), 143–152. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(02\)02220-8](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(02)02220-8)

- Rojas-Corrales, M. O., Gibert-Rahola, J., & Micó, J. A. (1998). Tramadol induces antidepressant-type effects in mice. *Life Sciences*, *63*(12), PL175-80. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(98\)00369-5](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(98)00369-5)
- Roselli, C. E., & Klosterman, S. a. (1998). Sexual differentiation of aromatase activity in the rat brain: effects of perinatal steroid exposure. *Endocrinology*, *139*(7), 3193–3201. <https://doi.org/10.1210/endo.139.7.6101>
- Rosen, R. C., & Althof, S. (2008, June). Impact of premature ejaculation: The psychological, quality of life, and sexual relationship consequence. *Journal of Sexual Medicine*. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2008.00825.x>
- Rothmund, Y., Qi, H.-X., Collins, C. E., & Kaas, J. H. (2002). The genitals and gluteal skin are represented lateral to the foot in anterior parietal somatosensory cortex of macaques. *Somatosensory & Motor Research*, *19*(4), 302–315. <https://doi.org/10.1080/0899022021000037773>
- Rothman, R. B., Jayanthi, S., Wang, X., Dersch, C. M., Cadet, J. L., Prisinzano, T., ... Baumann, M. H. (2003). High-Dose Fenfluramine Administration Decreases Serotonin Transporter Binding, but Not Serotonin Transporter Protein Levels, in Rat Forebrain. *Synapse*, *50*(3), 233–239. <https://doi.org/10.1002/syn.10266>
- Rowland, D., McMahon, C. G., Abdo, C., Chen, J., Jannini, E., Waldinger, M. D., & Ahn, T. Y. (2010). Disorders of orgasm and ejaculation in men. *Journal of Sexual Medicine*, *7*(4 PART 2), 1668–1686. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2010.01782.x>
- Rowland, D L, Cooper, S. E., & Slob, A. K. (1997). Re: Penile sensitivity in patients with primary premature ejaculation. *The Journal of Urology*, *158*(1), 187–188. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9186355>
- Rowland, David L. (1998). Penile sensitivity in men: A composite of recent findings. *Urology*, *52*(6), 1101–1105. [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(98\)00413-0](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(98)00413-0)
- Rowland, David L., Strassberg, D. S., De Gouveia Brazao, C. A., & Slob, A. K. (2000). Ejaculatory latency and control in men with premature ejaculation: An analysis across sexual activities using multiple sources of information. *Journal of Psychosomatic Research*, *48*(1), 69–77. [https://doi.org/10.1016/S0022-3999\(99\)00078-1](https://doi.org/10.1016/S0022-3999(99)00078-1)
- Rubio-Casillas, A., Rodríguez-Quintero, C. M., Rodríguez-Manzo, G., & Fernández-Guasti, A. (2015). Unraveling the modulatory actions of serotonin on male rat sexual responses. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *55*, 234–246. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.05.003>
- Ruytjens, L., Georgiadis, J. R., Holstege, G., Wit, H. P., Albers, F. W. J., & Willemsen, A. T. M. (2007). Functional sex differences in human primary auditory cortex. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, *34*(12), 2073–2081. <https://doi.org/10.1007/s00259-007-0517-z>
- Ryan, M. J. (1990). Sexual selection, sensory systems and sensory exploitation. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, *7*, 157–195. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19910191042>

- Sato, H., Shimanuki, Y., Saito, M., Toyoda, H., Nokubi, T., Maeda, Y., ... Kang, Y. (2008). Differential Columnar Processing in Local Circuits of Barrel and Insular Cortices. *Journal of Neuroscience*, 28(12), 3076–3089. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0172-08.2008>
- Segraves, R. T., & Balon, R. (2014). Antidepressant-induced sexual dysfunction in men. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 121, 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.11.003>
- Shankar, G. S. (2014). Serotonin and Sexual Dysfunction. *Journal of Autacoids*, 05(01). <https://doi.org/10.4172/2161-0479.1000e129>
- Sheikholeslami, B., Gholami, M., Lavasani, H., & Rouini, M. (2016). Evaluation of the route dependency of the pharmacokinetics and neuro-pharmacokinetics of tramadol and its main metabolites in rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.06.021>
- Shipton, E. A. (2000). Tramadol--present and future. *Anaesthesia and Intensive Care*, 28(4), 363–374. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10969362>
- Smits, B. M. G., Mudde, J. B., van de Belt, J., Verheul, M., Olivier, J., Homberg, J., ... Cuppen, E. (2006). Generation of gene knockouts and mutant models in the laboratory rat by ENU-driven target-selected mutagenesis. *Pharmacogenetics and Genomics*, 16(3), 159–169. <https://doi.org/10.1097/01.fpc.0000184960.82903.8f>
- Snoeren, E. M. S. S., Veening, J. G., Olivier, B., & Oosting, R. S. (2014). Serotonin 1A receptors and sexual behavior in male rats: A review. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 121, 102–114. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.11.007>
- Stahl, S. M. (1998). Mechanism of action of serotonin selective reuptake inhibitors. Serotonin receptors and pathways mediate therapeutic effects and side effects. *Journal of Affective Disorders*, 51(3), 215–235. [https://doi.org/10.1016/S0165-0327\(98\)00221-3](https://doi.org/10.1016/S0165-0327(98)00221-3)
- Steinbusch, H. W. M. (1981). Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-Cell bodies and terminals. *Neuroscience*, 6(4), 557–618. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(81\)90146-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(81)90146-9)
- Štrac, D. Š., Pivac, N., & Mück-Šeler, D. (2016). The serotonergic system and cognitive function. *Translational Neuroscience*. De Gruyter Open. <https://doi.org/10.1515/tnsci-2016-0007>
- Symonds, T., Roblin, D., Hart, K., & Althof, S. (2003). How does premature ejaculation impact a man's life? *Journal of Sex and Marital Therapy*, 29(5), 361–370. <https://doi.org/10.1080/00926230390224738>
- Trinh, K., & Storm, D. R. (2003). Vomeronasal organ detects odorants in absence of signaling through main olfactory epithelium. *Nature Neuroscience*, 6(5), 519–525. <https://doi.org/10.1038/nn1039>
- Truitt, W. A., & Coolen, L. M. (2002). Identification of a potential ejaculation generator in the spinal cord. *Science*, 297(5586), 1566–1569. <https://doi.org/10.1126/science.1073885>
- Uphouse, L., & Guptarak, J. (2010). {CHAPTER} 3.4 - Serotonin and Sexual Behavior. *Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin* (Vol. 21). Elsevier B.V.

[https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S1569-7339\(10\)70089-8](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S1569-7339(10)70089-8)

- Veening, J. G., & Coolen, L. M. (2014). Neural mechanisms of sexual behavior in the male rat: Emphasis on ejaculation-related circuits. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *121*, 170–183. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.12.017>
- Waldinger, M D, Hengeveld, M. W., Zwinderman, A. H., & Olivier, B. (1998). Effect of SSRI antidepressants on ejaculation: a double-blind, randomized, placebo-controlled study with fluoxetine, fluvoxamine, paroxetine, and sertraline. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, *18*(4), 274–281. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9690692>
- Waldinger, M D, Zwinderman, A. H., & Olivier, B. (2001a). Antidepressants and ejaculation: a double-blind, randomized, placebo-controlled, fixed-dose study with paroxetine, sertraline, and nefazodone. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, *21*(3), 293–297. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11386492>
- Waldinger, M D, Zwinderman, A. H., & Olivier, B. (2001b). SSRIs and ejaculation: a double-blind, randomized, fixed-dose study with paroxetine and citalopram. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, *21*(6), 556–560. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11763001>
- Waldinger, Marcel D. (1998). Neuroanatomy and neurobiology of the central serotonergic system in sexual functioning. *European Psychiatry*, *13*, 183s. [https://doi.org/10.1016/S0924-9338\(99\)80186-2](https://doi.org/10.1016/S0924-9338(99)80186-2)
- Waldinger, Marcel D. (2002). The Neurobiological Approach to Premature Ejaculation. *Journal of Urology*, *168*(6), 2359–2367. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)64146-8](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)64146-8)
- Waldinger, Marcel D. (2005). Lifelong premature ejaculation: current debate on definition and treatment. *The Journal of Men's Health & Gender*, *2*(3), 333–338. <https://doi.org/10.1016/j.jmhg.2005.06.007>
- Waldinger, & Marcel, D. (2007). Premature Ejaculation: Definition and Drug Treatment. *Drugs*, *67*(4), 547–568. Retrieved from [citeulike-article-id:1160258](http://www.citeulike-article-id:1160258)
- Waldinger, Marcel D., & Olivier, B. (2005). Animal models of premature and retarded ejaculation. *World Journal of Urology*, *23*(2), 115–118. <https://doi.org/10.1007/s00345-004-0493-x>
- Waldinger, Marcel D., Zwinderman, A., Olivier, B., & Schweitzer, D. H. (2005). Proposal for a definition of lifelong premature ejaculation based on epidemiological stopwatch data. *Journal of Sexual Medicine*, *2*, 498–507. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2005.00069.x>
- Waldinger, Marcel D. (2006). Emerging drugs for premature ejaculation. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, *11*(1), 99–109. <https://doi.org/doi:10.1517/14728214.11.1.99>
- Waldinger, Marcel D. (2007). Premature ejaculation: state of the art. *The Urologic Clinics of North America*, *34*(4), 591–599, vii–viii. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2007.08.011>
- Waldinger, Marcel D, Berendsen, H. H. G. G., Blok, B. F. M. M., Olivier, B., & Holstege, G. (1998). Premature ejaculation and serotonergic antidepressants-induced delayed ejaculation: The involvement of the serotonergic system. *Behavioural Brain Research*, *92*(2), 111–118.

[https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(97\)00183-6](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(97)00183-6)

- Waldinger, Marcel D, & Olivier, B. (2004). Utility of selective serotonin reuptake inhibitors in premature ejaculation. *Current Opinion in Investigational Drugs (London, England : 2000)*, 5(7), 743–747. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15298071>
- Wong-Riley, M. T. T. (1989). Cytochrome oxidase: an endogenous marker for neuron activity. *Trends in Neurosciences*, 12(3), 94–101.
- Xin, Z. C., Chung, W. S., Choi, Y. D., Seong, D. H., Choi, Y. J., & Choi, H. K. (1997). Penile sensitivity in patients with primary premature ejaculation. *Journal of Urology*, 158, 187–188.
- Yang, L., Qian, S., Liu, H., Liu, L., Pu, C., Han, P., & Wei, Q. (2013). Role of tramadol in premature ejaculation: A systematic review and meta-analysis. *Urologia Internationalis*. <https://doi.org/10.1159/000348826>
- Yells, D. P., Hendricks, S. E., & Prendergast, M. A. (1992). Lesions of the nucleus paragigantocellularis: effects on mating behavior in male rats. *Brain Research*, 596(1–2), 73–79. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)91534-L](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)91534-L)