



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

***EVALUACIÓN DE LA CONSISTENCIA DE LOS ENDOFENOTIPOS EYACULATORIOS  
DE LA RATA MACHO COMPARADA CON LA DIVERSIDAD DE CONDUCTA  
COPULATORIA IDENTIFICADA MEDIANTE UN ANÁLISIS MULTIVARIANTE***

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**ITZTLI GRACIELA TREJO SÁNCHEZ**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**COMITÉ TUTOR**

**DRA. NORMA MORENO MENDOZA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**DR. ENRIQUE PEDERNERA ASTEGIANO  
FACULTAD DE MEDICINA**

**CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE DE 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.

# APOYOS

---

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México que a través de su Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas me permitió concluir los estudios de posgrado, así como mi formación académica y profesional.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT, por el apoyo de manutención otorgado durante el periodo escolar establecido para concluir mis estudios de posgrado a través de la beca 345024.

Agradezco a la dra. Marie Bedos, al dr. Jesús Ramírez, a la dra. Margarita Gómez, a la dra. Diana Esquivel y al M. en C. Zan Cuiriz por el apoyo técnico brindado durante el desarrollo del presente trabajo de investigación.

# ÍNDICE

---

• Resumen.....	4
• Introducción.....	5
• Marco teórico.....	7
<i>Capítulo 1. Bases neurobiológicas de la conducta sexual de la rata macho.</i>	
<i>Capítulo 2. Diversidad de la conducta copulatoria de la rata macho.</i>	
<i>Capítulo 3 ¿Cómo se origina la diversidad de la conducta sexual?</i>	
<i>Capítulo 4. Limitaciones en los estudios de la diversidad de la conducta sexual.</i>	
<i>Capítulo 5. La diversidad de la conducta copulatoria de la rata macho propuesta como un mosaico individual de parámetros conductuales indeterminado por endofenotipos.</i>	
• Justificación.....	26
• Hipótesis.....	27
• Objetivos.....	27
• Materiales y métodos.....	28
• Resultados.....	33
• Discusión.....	48
• Conclusiones.....	61
• Bibliografía.....	62
• Anexos.....	71
➤ A1. Copia del artículo publicado.	
➤ A2. Ligas a las páginas de internet con las bases de datos y códigos en R	
➤ A3. Condiciones de amplificación estandarizadas para PCR cuantitativa.	
➤ A4. Figuras suplementarias.	

# RESUMEN

---

Diferentes manifestaciones de la conducta sexual son concebidas como fenotipos separados. Se asume que cada fenotipo sexual es asociado con un cerebro característico. Estas nociones han justificado la categorización de los machos copuladores de diferentes especies de acuerdo a sus latencias (EL) o frecuencias (número de eyaculaciones acumuladas, EN) de eyaculación. Por ejemplo, los humanos y otras especies, incluyendo a la rata macho, que muestran eyaculación prematura, normal o retardada son asumidos como endofenotipos diferentes. Sin embargo, este concepto contradice la evidencia que apoya que la conducta sexual es altamente variable intra-sexualmente y que la morfología funcional del cerebro masculino o femenino representa un mosaico sexual intrincado. Por ejemplo, para que los endofenotipos copulatorios sean considerados un concepto biológico válido, tendrían que demostrar consistencia interna a varios niveles de organización (incluyendo la arquitectura genética) después de ser retados por factores intrínsecos o extrínsecos. Así, probamos la consistencia de los presuntos endofenotipos al evaluar si la conducta copulatoria y la expresión relativa de genes de relevancia sexual en algunas áreas límbicas son específicas de cada uno de los endofenotipos por EL o EN. Para ello, una muestra de ratas macho copuladores fueron clasificados en grupos que consistentemente presentaron latencias de eyaculación corta, promedio o larga; o bien, muy alto, alto, promedio, bajo o muy bajo número de eyaculaciones. Posteriormente, la consistencia de los endofenotipos fue analizada al introducir como co-variable de clasificación otros parámetros copulatorios adicionales a EL y EN o los niveles de expresión génica relativa de AR, PR, ESR1, CYP19, DNMT1, DNMT3a en amígdala, área pre-óptica medial, hipotálamo ventro-medial y bulbo olfatorio. Encontramos un extenso traslape de los diferentes parámetros copulatorios y niveles de expresión génica relativa en las áreas límbicas entre los machos clasificados en endofenotipos por EL o EN, lo cual, no es congruente con la hipótesis de que existen diferentes endofenotipos copulatorios asociados con características cerebro-específicas.

# INTRODUCCIÓN

---

*“Es el cambio, el cambio continuo, el cambio inevitable, el factor dominante de la sociedad actual.”*

-Isaac Asimov

A partir de una sociedad en cambio constante surgen también constantes inquietudes, conflictos, dilemas y disyuntivas a resolver, en lo que la ciencia no queda al margen. Por el contrario, la participación activa del científico en la resolución de estos problemas es una necesidad que exige también el cambio en la forma como se estudian los fenómenos en la ciencia y nos lleva a romper y reformular paradigmas. Por lo tanto, es menester que el científico esté involucrado activamente en la vida social para que pueda reconocer y prever los conflictos a los que como sociedad nos enfrentamos.

Uno de los grandes problemas que hemos encarado es la diversidad, un fenómeno evidente que no basta con reconocer, además es necesario entenderlo a fondo para romper los prejuicios que impiden concebirlo como natural, dinámico, irrefrenable y necesario, pues aunque la diversidad está presente en lo cotidiano, cuando hablamos de diversidad sexual, lo cotidiano se transforma en insólito y el fenómeno en tabú. Es aquí cuando la sociedad exige una explicación científica a la diversidad sexual ¿Qué es? ¿Dónde está? ¿Cómo surge y de dónde? Más aún, ¿Qué podemos esperar a futuro de la diversidad sexual? Muchas de estas preguntas comienzan a rebasar la capacidad de respuesta de la ciencia, no solo por la falta de científicos en el área, sino también porque mucho de lo que sabemos parte del dogma que determina la diversidad sexual agrupando sus diferentes manifestaciones en categorías que corresponden a diferentes cualidades fisiológicas. Esta forma de estudio es útil para simplificar y aplicar generalidades a un fenómeno, pero pierde alcance y validez cuando queremos comprender el panorama completo de la diversidad. Por lo tanto, también requerimos cambiar la forma como estudiamos la diversidad sexual para cubrir la demanda de ser comprendida por esta sociedad cambiante.

Actualmente, la conducta sexual es concebida mediante dos diferentes enfoques, uno de ellos establece que las diferencias inter- e intra-sexuales son delimitadas categóricamente a la vez que se relacionan con las diferentes características morfo-fisiológicas típicas de cada categoría

pre-establecida y caracterizada<sup>1-9</sup>. El segundo planteamiento, considera que no existen límites claros entre las diferentes manifestaciones de la conducta sexual, sino que son graduales e individualmente características<sup>10-16</sup>. El presente trabajo tiene como objetivo analizar la propuesta categórica en términos de la variabilidad y consistencia de los endofenotipos típicamente descritos en la rata macho, de acuerdo a la latencia y frecuencia de eyaculación, para determinar si la diversidad de la conducta copulatoria se delimita y agrupa consistentemente a través de un par de parámetros conductuales y al mismo tiempo, explorar la diversidad en una muestra de animales copuladores para aportar hacia uno u otro enfoque de la conducta sexual.

Nos valimos del modelo animal de la rata macho, ya que es el más utilizado para estudiar la fisiología de la conducta sexual, por lo que gran parte del conocimiento que tenemos en el tema ha sido generado a partir de las premisas que subyacen a este modelo 1) la diversidad de la conducta copulatoria se ciñe a categorías características y mutuamente excluyentes o endofenotipos, los cuales son estables durante la mayor parte de la vida del individuo y no son dependientes de la experiencia sexual y 2) cada categoría está supeditada a características biológicas específicas que determinan la conducta copulatoria y por ende, la diversidad de dicha conducta. Si bien hablamos de un modelo animal, estos supuestos son aplicados a muchas de las concepciones que tenemos de la conducta sexual humana, la cual también consideramos, en muchos aspectos, categórica e inmutable o poco cambiante. A partir de este dogma, nos reformulamos qué tanta diversidad podíamos encontrar dentro de una misma categoría/endofenotipo y qué tan diferentes eran entre ellos, es decir, qué tan consistente es este orden de categorización. Dado que para nuestro estudio nos valemos de un modelo animal, el marco teórico se enfoca en la información científica que se tiene sobre la conducta copulatoria de la rata macho, principalmente en los capítulos 1 y 2, para el 3 y el 4 ampliaré la información con evidencia que ha retado al paradigma de la diversidad de la conducta sexual como una característica discreta tanto modelos animales y también en humanos para dar sustento al capítulo 5. Finalmente, en la sección de discusión de resultados, retomaré el tema de la diversidad sexual humana como un fenómeno que busca explicación científica para contrastar con nuestros resultados y concluir este trabajo.

# MARCO TEÓRICO

---

## *Capítulo 1. Bases neurobiológicas de la conducta sexual de la rata macho.*

La conducta sexual en la rata macho es conformada por tres etapas consecutivas, la primera corresponde a la etapa de motivación o cortejo, la cual tiene como objetivo identificar posible(s) pareja(s) y comprende conductas como persecución y olfateo de la zona ano-genital de la hembra, así como el acicalamiento genital, los cuales varían de manera contexto-dependiente; es decir, dependerá en gran medida del ambiente y de la situación, si se trata de un encuentro monoándrico o si habrá que competir con otros machos de la misma especie, el estado hormonal de la hembra y también si hay más de una pareja disponible, etc<sup>17,18</sup>. Una vez que el macho ha examinado la situación y a través de las diferentes señales del ambiente ha decidido continuar con el encuentro sexual, comienza la segunda etapa, de cópula o de consumación, esta conducta está descrita por patrones motores característicos e identificables a simple vista, motivo por el cual, se ha considerado que la conducta copulatoria de la rata macho es estereotipada<sup>3,19,20</sup>.

Los patrones motores que componen la conducta copulatoria son la monta, la intromisión y la eyaculación y se llevan a cabo en serie de forma organizada, tal que la conducta copulatoria comienza con la primera monta, que se identifica cuando el macho se coloca sobre la hembra con las regiones pélvica y perianal apoyadas sobre la grupa, mientras las patas delanteras del macho sujetan los flancos, lo cual provoca en la hembra el reflejo de lordosis, es decir, el arqueamiento del dorso por elevación de la cabeza y la grupa; además, es posible que el macho presente movimientos pélvicos hacia adelante y hacia atrás<sup>19,21</sup>. Después de una serie de montas variable, el macho comienza a desplegar intromisiones, la inserción del pene en la vagina de la hembra, que se distingue del patrón de monta por una duración mayor (aprox. 400 milisegundos) y una sujeción más firme de la hembra, a la que desmonta bruscamente para comúnmente, acicalarse el pene. En este punto de la cópula, el macho puede presentar montas e intromisiones de manera intercalada para finalmente dar lugar a la eyaculación, durante ésta, el macho monta a la hembra realizando movimientos pélvicos hasta que realiza una intromisión



profunda y con una duración mayor a las intromisiones anteriores, pues es cuando emite el semen en la vagina, después de lo cual, el macho eleva la porción superior del cuerpo para desmontar a la hembra y se acicala los genitales vastamente<sup>21,22</sup>.

Posterior a la eyaculación, ocurre la última etapa de la conducta copulatoria de la rata macho, mejor conocida como periodo refractario, un lapso de 5 a 10 minutos durante el cual, el macho no realiza ningún patrón de conducta copulatoria aún en presencia de estímulo sexual; sin embargo, cuando se le presenta al macho una nueva hembra, este periodo se acorta. Se ha propuesto que el periodo refractario sirve para enfriar algunas regiones del sistema límbico como el área preóptica, pues durante la cópula la temperatura sube alrededor de 1°C; esto ocurre mediante la emisión de vocalizaciones ultrasónicas, pues la sangre podría ser redirigida a la nariz mientras el aire es inhalado y exhalado con fuerza, lo que produce las vocalizaciones ultrasónicas<sup>18,19</sup>. A partir de los patrones de conducta copulatoria de monta, intromisión y eyaculación, podemos evaluar las variables de latencia y frecuencia para cada patrón. La latencia de monta o intromisión es el tiempo que tarda un macho en realizar la primera monta o intromisión a partir del momento en que se deja al alcance de una hembra. A diferencia, la latencia de eyaculación es el tiempo que tarda un macho en presentar una eyaculación a partir de que despliega la primera intromisión. La frecuencia de monta o de intromisión se refiere al número de montas o de intromisiones realizadas en una serie eyaculatoria, es decir, en el conjunto de montas e intromisiones que cada rata macho requiere para alcanzar una eyaculación<sup>18,19,22</sup>.

La serie de patrones conductuales descritos ocurre en un orden tal que cada uno proporciona información sensorial que es integrada para responder de manera adecuada con el siguiente patrón de conducta copulatoria. La información quimiosensorial de relevancia sexual percibida a través del epitelio olfativo y el órgano vomeronasal es integrada en el bulbo olfatorio (BO), el cual manda aferencias hacia la amígdala (AMG), una de las principales estructuras de procesamiento de la información sensorial que envía la información hacia el hipotálamo, teniendo como área de relevo el núcleo del lecho de la estría terminal (BNST)<sup>21,23-25</sup>. Ya sea desde la amígdala medial directamente o desde BNST, la información es integrada en el área preóptica medial (MPOA) o en el hipotálamo ventro-medial (VMH). Este sistema general,

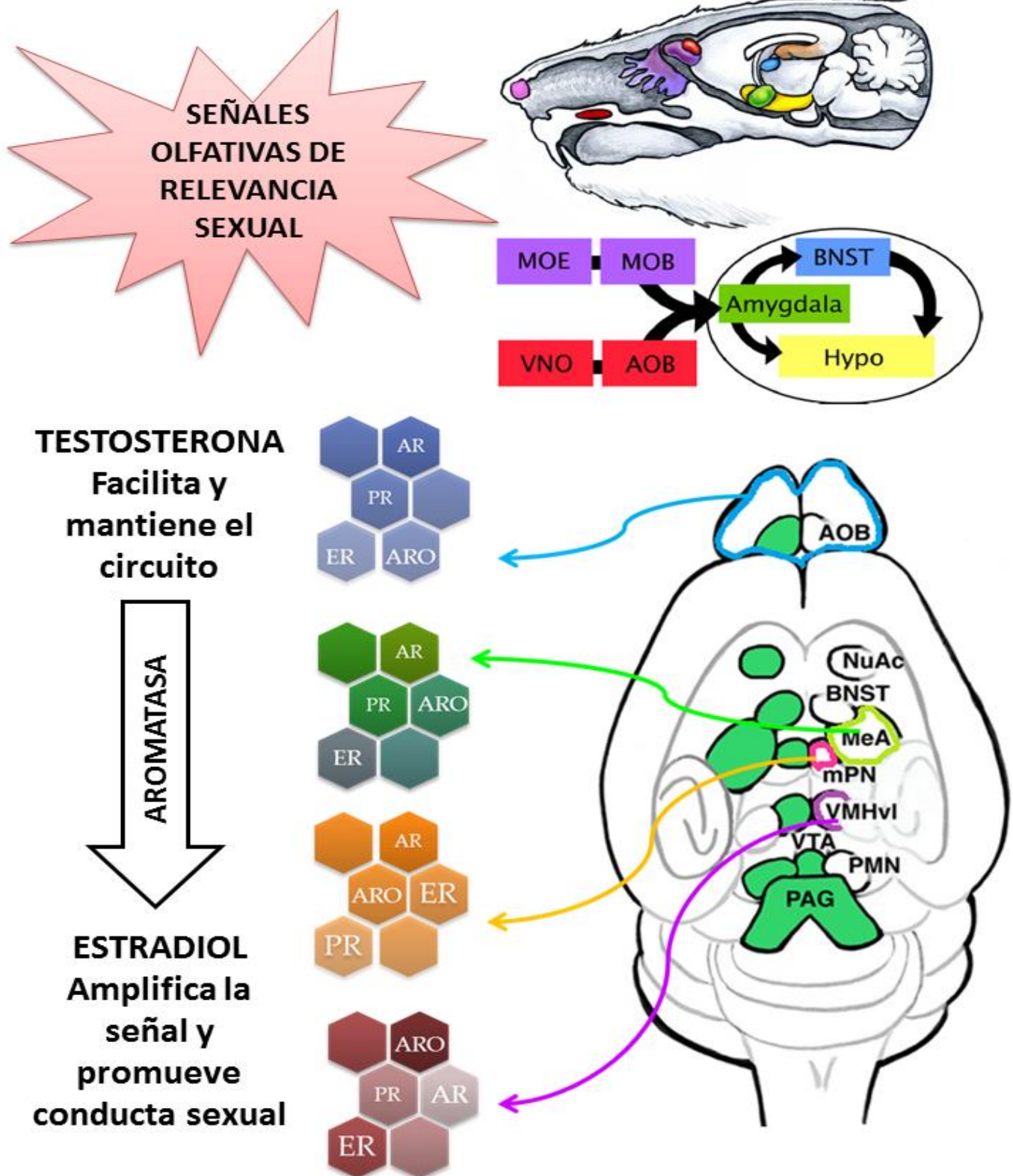
mantiene las conductas tanto apetitiva como copulatoria a nivel central, sin embargo, para el caso de la fase apetitiva, la información requiere ser procesada en el área tegmental ventral y del núcleo accumbens, mientras que para la conducta copulatoria, las aferencias llegan al cerebro medio, a la médula espinal en el núcleo gris periacueductal para llegar a la región espinal lumbosacra y ejecutar los patrones motores característicos<sup>24,26</sup>. En la figura 1, se muestra un esquema integrado del procesamiento de la información y las áreas anatómicas que la integran para dar lugar a la conducta sexual masculina.

Se plantea que las estructuras anatómicas del sistema límbico que regulan la conducta sexual llevan a cabo sus funciones dado que son sensibles a las hormonas sexuales, las cuales, por unión a sus receptores facilitan la conducta sexual masculina y mantienen el circuito anatómico, celular y molecularmente apto para responder a la información sensorial de relevancia sexual<sup>18,19,27</sup>. Se sabe que desde etapas tempranas del desarrollo de la rata macho, durante el periodo de diferenciación sexual del cerebro, alrededor del día 18 de gestación y hasta los primeros días después del nacimiento, la testosterona y su metabolito, el estradiol, conforman y organizan el cerebro masculino tal que al alcanzar la madurez sexual los machos puedan desplegar los patrones de conducta copulatoria ante un estímulo sexual. Por otro lado, en ausencia de testosterona que pueda ser convertida a estradiol por acción de la enzima aromatasa, se desarrolla el circuito femenino que responderá al estradiol y a la progesterona para desplegar la conducta sexual femenina al alcanzar la madurez<sup>27,28</sup>.

En el macho adulto, la testosterona es la hormona que mantiene la conducta sexual masculina desde la fase apetitiva ya sea por la unión directa con el receptor a andrógenos (AR) o como precursor de la dihidrotestosterona (DHT), metabolito reducido que presenta una afinidad 5 veces mayor al receptor. Para la fase de cópula, además, es importante el papel de los receptores a estrógenos (ER) alfa y beta que unen a otro metabolito de la testosterona, el estradiol, formado por acción de la enzima aromatasa, presente también en el sistema límbico<sup>19</sup>. La combinación de estas hormonas es necesaria para que la conducta apetitiva y copulatoria se desplieguen completamente en la rata macho<sup>29</sup>. Tras la castración, los niveles en suero de testosterona son indetectables dentro de las primeras 24 horas, la pérdida de la conducta copulatoria ocurre después de días o semanas, lo cual refleja la variabilidad de efectos de la

testosterona en la conducta copulatoria. Se sabe que la capacidad de cópula ocurre en la rata macho entre los días 45-75 de vida, sin embargo, la castración previa a este periodo impide que se despliegue la conducta copulatoria. Los machos viejos pierden la capacidad de eyacular y no es restaurada con la administración de testosterona debido a que hay un declive de ER alfa pero no de AR<sup>30</sup>. Las hormonas sexuales actúan en conjunto con 10 diferentes neurotransmisores para que se ejecute la conducta sexual. La dopamina DA, es un promotor de la conducta copulatoria, la administración de su agonista amorfina en animales castrados incrementa el número de montas y este efecto es bloqueado por la administración de los antagonistas del receptor de progesterona, PR, AR y ER. La liberación de DA en MPOA, a su vez, favorece la síntesis de óxido nítrico, NO, imprescindible para la eyaculación a nivel central y espinal, los inhibidores de NO en MPOA impiden la conducta copulatoria en ratas macho vírgenes y la disminuyen en los animales que tuvieron experiencia copulatoria previa. La DA, la oxitocina y el glutamato incrementan la producción de NO en las células oxitocinérgicas del núcleo paraventricular, PVN, del hipotálamo promoviendo la liberación de oxitocina en el hipocampo y en la espina dorsal, donde facilita la erección y la emisión seminal, efectos que son inhibidos por GABA y opioides<sup>23,25,31,32</sup>.

Bajo este esquema, la conducta copulatoria de la rata macho, se puede apreciar como un circuito específico, delimitado e invariante; en congruencia, la variabilidad conductual asociada a un circuito limitado, también es limitada. Por lo tanto, no es de asombrarse que la diversidad de la conducta copulatoria masculina sea acotada a algunas categorías con características particulares, pues de otra manera, no podría ser explicada a tevé de un único circuito establecido desde la gestación y reforzado en la madurez por acción de las hormonas sexuales. No obstante, la evidencia experimental demuestra que hay una gran variabilidad inter-individual en los patrones de conducta copulatoria en una misma especie<sup>3,6,20,22</sup>, lo cual nos lleva a cuestionar 1) si el modelo neurobiológico que subyace la conducta copulatoria es más flexible de lo que se ha asentado, 2) si al categorizar la conducta copulatoria estamos enmascarando la diversidad intra- e inter-individuales y 3) si verdaderamente estas categorías son consistentes y bien delimitadas para describir la diversidad de la conducta copulatoria.



**FIGURA 1. PANORAMA GENERAL DE LA NEUROBIOLÓGÍA DE LA CONDUCTA SEXUAL DE LA RATA MACHO.** Las señales olfativas de relevancia sexual son captadas por el bulbo olfatorio y procesadas en diversas estructuras sistema límbico, donde las hormonas sexuales mantienen la conducta sexual a través de la unión a sus receptores. MOE, epitelio olfativo principal, MOB, bulbo olfatorio principal, AOB, bulbo olfatorio accesorio, VNO, órgano vomeronasal.

## ***Capítulo 2. Diversidad de la conducta copulatoria de la rata macho.***

En primates no humanos, ovejas, roedores, aves e incluso en peces se ha reportado una amplia variabilidad en diferentes parámetros de la conducta sexual<sup>1,20,33-35</sup>. Esta diversidad conductual, tiene un impacto sobre los procesos de competencia espermática y selección sexual como estrategia para la reproducción bajo diferentes circunstancias ambientales, por lo que es plausible que en una población emerjan o sean aprendidas variaciones conductuales que resulten en una ventaja para la reproducción sexual<sup>22,36</sup>. En la rata macho, a las variaciones naturales de la conducta copulatoria dentro de una población se les denomina endofenotipos y corresponden con las diferentes categorías sexuales establecidas arbitrariamente con referencia a un solo patrón de conducta copulatoria<sup>6,20,37</sup>; el más común es la latencia de eyaculación, aunque el número de eyaculaciones presentadas en un lapso de observación también ha sido ampliamente utilizada como criterio de categorización<sup>3,6,38</sup>. Dichas categorías han ceñido hasta ahora la diversidad de la conducta sexual, tal que los machos de una población pueden ser divididos entre 2 o hasta 5 endofenotipos en el caso de rata macho. Sin embargo, la alta variabilidad en los parámetros que describen la conducta copulatoria hace factible que la diversidad vaya más allá de los endofenotipos típicamente descritos.

En la rata macho existen bastantes datos que nos permiten afirmar la heterogeneidad de la conducta copulatoria. Inicialmente, se describió un grupo de poca incidencia (entre 3-10% de la población<sup>39</sup>) que no mostraba ningún patrón de conducta copulatoria frente a una hembra receptiva en pruebas conductuales de hasta una hora, además de presentar una mínima o nula motivación sexual. A esta pequeña proporción de ratas macho se les denominó *No Copuladores* (NC)<sup>39-41</sup>. Asimismo, se describió otro grupo de ratas macho que despliegan una eyaculación hasta en una hora de prueba conductual monoándrica, por lo que a los machos que caen dentro de esta categoría se les nombró Copuladores Lentos, o bien, por el término en inglés, *Sexually Sluggish* (SS)<sup>3,6,42</sup>. Aunque ambas categorías han mostrado tener diferencias estadísticamente significativas en el inmuno-marcaje para receptores de hormonas sexuales y actividad de aromatasa en comparación con los machos copuladores<sup>38,43,44</sup>; no muestran diferencias significativas en cuanto niveles circulantes de testosterona, tampoco en la discriminación y

preferencia de olores sexualmente relevantes ni para procesar la señal por la vía vomeronasal<sup>40,45</sup>.

En principio, estas tres categorías, Copuladores, Copuladores Lentos y No Copuladores fueron de interés para el estudio de la neurobiología de la conducta sexual, sin embargo, dentro de los Copuladores también se encontraron diferentes endofenotipos clasificados de acuerdo a la latencia o frecuencia de eyaculación. Según la latencia de eyaculación, los machos pueden ser clasificados como eyaculadores lentos, normales y rápidos tras evaluar la conducta copulatoria en al menos 4 pruebas monoándricas de 30 minutos<sup>3</sup>. Respecto a la frecuencia de eyaculación, la clasificación se realiza con base en el número de eyaculaciones presentadas en al menos 3 pruebas conductuales<sup>3</sup>. En un estudio se evaluó a una población de ratas macho con 546 individuos, en las que se observó que aproximadamente 10% de los animales no alcanzaba la eyaculación, en contraste con otro 10% que presentó cuatro o más eyaculaciones<sup>37</sup>. Además, se reportó que la frecuencia de intromisión y latencia de monta fueron similares entre ambos grupos de animales. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en otros parámetros de conducta copulatoria, la única diferencia es la latencia de eyaculación. No obstante, la latencia de eyaculación es un parámetro entre al menos 6 que constituyen la conducta copulatoria de la rata macho.

En correspondencia con el modelo neurobiológico de la conducta sexual masculina descrito en el capítulo anterior, bajo un único circuito fijo que dirige la conducta sexual, la única variable es la biodisponibilidad a hormonas sexuales. Sabiendo que no hay diferencias en los niveles de testosterona entre categorías, se ha planteado que es a nivel de las estructuras del sistema límbico que integran el circuito donde radica la variabilidad de los efectos de las hormonas sexuales y por ende, de la conducta copulatoria, ya sea por disponibilidad de receptores o por actividad enzimática para la síntesis local. Al respecto, se ha reportado que tras la castración de machos copuladores hay animales que pueden dejar de desplegar la conducta sexual en unos días, mientras que en otros, el mismo efecto se observa después de varias semanas<sup>19</sup>. Del mismo modo, al administrar con testosterona en dosis fisiológicas a ratas macho castradas, la conducta copulatoria es totalmente restaurada en 5-10 días, pero este lapso no solo incrementa, sino que es aún más variable cuando el animal lleva largo tiempo castrado sin administración

de testosterona<sup>17,18</sup>. A nivel del sistema límbico, el área preóptica medial, es una estructura primordial en la integración de las señales sensoriales y en la respuesta motora de la conducta sexual, por lo que es altamente sensible a la acción de las hormonas sexuales; se sabe que los implantes de estradiol o testosterona en MPOA restauran la conducta copulatoria en animales castrados, pero al igual que con la administración sistémica, el porcentaje de animales que presentan montas, intromisiones o que eyacula, es variable a lo largo de 5 meses de seguimiento<sup>46</sup>. Igualmente, en el bulbo olfatorio, la amígdala y el hipotálamo ventro-medial han sido reportados diferentes efectos al bloquear la función de las hormonas sexuales antes mencionadas ya sea a nivel del receptor o en algún paso en la síntesis<sup>47</sup>.

En resumen, la diversidad de la conducta copulatoria de la rata macho está restringida a unas cuantas categorías premeditadas de acuerdo a la latencia o frecuencia de eyaculación en concordancia con el modelo neurobiológico de un único circuito permanente estructurado por acción de las hormonas sexuales. Por lo tanto, la diversidad de la conducta copulatoria, es decir, los diferentes endofenotipos, surgen a través de las diferencias particulares para cada uno en cuanto a la disponibilidad de receptores y síntesis de hormonas sexuales en el sistema límbico. No obstante, esta concepción imposibilita observar la diversidad intra-categoría, ya que hasta ahora se han reportado diferencias entre promedios por categoría, lo cual pierde alcance al considerar que la conducta sexual se encuentra bajo constante influencia del ambiente. Por ejemplo, se ha demostrado que una misma rata macho puede acortar su latencia de eyaculación cuando se le pone a competir con otros machos en comparación a la latencia registrada bajo un encuentro monoándrico<sup>22,33,36</sup>. Si los diferentes endofenotipos no son estables, tampoco podrían emerger de un patrón constante y particular de expresión de receptores y síntesis local de hormonas sexuales, pues ya no corresponde con un fenómeno dinámico y flexible; en consecuencia, se han formulado otras propuestas para explicar cómo surge la diversidad de la conducta sexual.

### ***Capítulo 3 ¿Cómo se origina la diversidad de la conducta sexual?***

El encabezado de este capítulo es una interrogante trascendental a la que se ha buscado responder desde diversos enfoques debido a que existen múltiples factores que influyen sobre la conducta sexual y más aún en los humanos, al incorporar el factor cultural y el social, por lo que requiere una perspectiva multidisciplinaria que permita comprender a fondo la naturaleza de la diversidad sexual. Para explicar dichas variaciones, en lo que atañe a las Ciencias Biológicas, el origen más elemental de la diversidad de la conducta sexual radica en el dimorfismo sexual del cerebro masculino y femenino en correspondencia con el dimorfismo conductual determinado genéticamente y desarrollado por acción de las hormonas sexuales desde la gestación hasta alcanzar la madurez sexual<sup>28,48,49</sup>. A partir de esta dicotomía de la conducta sexual masculina y femenina surge el planteamiento de segregar de forma categórica las variaciones conductuales intra- e inter-sexuales atribuyéndolas a características neurobiológicas categoría-específicas<sup>50,51</sup>.

Como se mencionó en el capítulo anterior, se sugiere que los diferentes fenotipos copulatorios de los machos se deben a las diferencias en la expresión de receptores a hormonas sexuales y a la actividad de las enzimas que las sintetizan en las diferentes estructuras anatómicas del sistema límbico. Paredes y colaboradores han reportado que los machos no copuladores tienen menos células inmunorreactivas para los receptores de andrógenos y de estrógenos alfa; así como una menor actividad de aromatasa en amígdala medial y el área preóptica medial respecto a los machos copuladores<sup>38,43,44</sup>. En 2015, realizaron un estudio similar en el que observaron que en comparación con los machos copuladores, la expresión relativa del gen del receptor a andrógenos está incrementada en MPOA, mientras que en el bulbo olfatorio está disminuida, al igual que la expresión de gen de aromatasa en la amígdala de los machos copuladores lentos o *sexually sluggish*<sup>38</sup>. La tabla 1 contiene las diferencias reportadas entre los diferentes fenotipos copulatorios. No obstante, el objetivo de dichos estudios es encontrar diferencias significativas entre categorías establecidas deliberadamente, analizando medias categóricas que restringen la muestra y disimulan la diversidad conductual.



**TABLA 1. DIFERENCIAS FISIOLÓGICAS REPORTADAS ENTRE COPULADORES Y NO COPULADORES O *SEXUALLY SLUGGISH* EN LA RATA MACHO**

PARÁMETRO EVALUADO	SS~/NC* vs COPULADORES
Niveles de testosterona y estradiol en plasma	Sin diferencias <sup>1</sup>
Emisión seminal espontánea y reflejo del pene	Sin diferencias <sup>1</sup>
Expresión génica relativa de CYP19 (aromatasa) en amígdala~	Incremento <sup>2</sup>
Número de células inmuno-reactivas a AR/ESR1 en amígdala*	Incremento <sup>3</sup>
Expresión génica relativa de AR y CYP19 en MPOA ~	Incremento <sup>2</sup>
Número de células inmuno-reactivas a ESR1 y actividad de aromatasa en MPOA *	Decremento <sup>3</sup>
Expresión génica relativa de AR en bulbo olfatorio~	Decremento <sup>2</sup>
Expresión génica relativa de ESR1 en bulbo olfatorio~	Incremento <sup>2</sup>

1. Portillo W., et. Al., 2013. *Hormones and Behavior* 64, 7080.
2. Antaramián A., et. al. 2015. *J Sex Med* 12:2267–2275.
3. Portillo W. et. Al. 2006. *Journal of Neuroendocrinology* 18, 168–176

Otra de las propuestas tradicionales al origen de la diversidad conductual es la determinación genética heredada a la progenie y modificada, principalmente, a través de mutaciones en el genoma. Un ejemplo es el caso de los topillos, mientras que muchas especies son polígamas, los machos de la especie *Microtus ochrogaster* son monógamos debido a una mutación en el gen *avpr1a* que les permite expresar más receptor V1a de vasopresina en pallidum ventral; ya que al depletar el gen *avpr1* de forma selectiva, la especie monógama pierde esta conducta y

viceversa, al aumentar la expresión del mismo gen en la especie polígama, los machos presentaban un comportamiento significativamente más monógamo en comparación con los animales que no habían sido tratados para expresar más el gen<sup>52</sup>. Además, esta propuesta plantea que la descendencia de un macho categorizado se mantendrá en la misma categoría; es decir, la prole de machos sementales, dará lugar a otros machos sementales<sup>3,6,37,53</sup>. En el caso del modelo de la rata macho, se utilizan cepas endogámicas de machos copuladores, por lo que se espera que las crías tengan el mismo fenotipo; sin embargo, dentro de estas poblaciones surgen de forma natural otros fenotipos copulatorios, los denominados endofenotipos y que se han caracterizado comúnmente como no copuladores, eyaculadores rápidos, eyaculadores lentos y normo-eyaculadores, como se refirió en el capítulo anterior. Por lo tanto, la propuesta de determinación genética se vuelve deficiente al considerar estos endofenotipos, pues claramente, la diversidad de la conducta copulatoria surge también dentro de poblaciones de machos genéticamente idénticos.

Conjuntando la epigenética y la hipótesis de Barker, que establece que las diferentes señales ambientales recibidas durante el desarrollo de un individuo dan lugar a las variaciones en la fisiología de un organismo, los neurobiólogos han estudiado el efecto de diferentes señales ambientales sobre la conducta sexual tanto en humanos como en modelos animales<sup>54-59</sup>. En humanos, se propone que hay marcas epigenéticas que pueden ser heredadas o adquiridas y que promueven cierto grado de sensibilidad a las hormonas sexuales durante el desarrollo fetal, con lo cual podrían favorecer la masculinización o feminización del cerebro independientemente del sexo gonadal<sup>60-63</sup>; es decir, la epigenética podría ser una de los responsables de la determinación biológica a la orientación sexual<sup>14,64,65</sup>. Así lo demuestra un estudio realizado en 2012 en el que al analizar las marcas epigenéticas de la metilación del ADN en 37 parejas de gemelos univitelinos en las que un individuo era homosexual y el otro heterosexual, se encontraron cinco regiones en el genoma que difieren en el grado de metilación y que de acuerdo con Rice y colaboradores podrían estar relacionadas con la distinción en la orientación sexual, tal que algunas marcas serían determinadas por ciertas diferencias en el ambiente fetal de forma individual<sup>65,66</sup>.

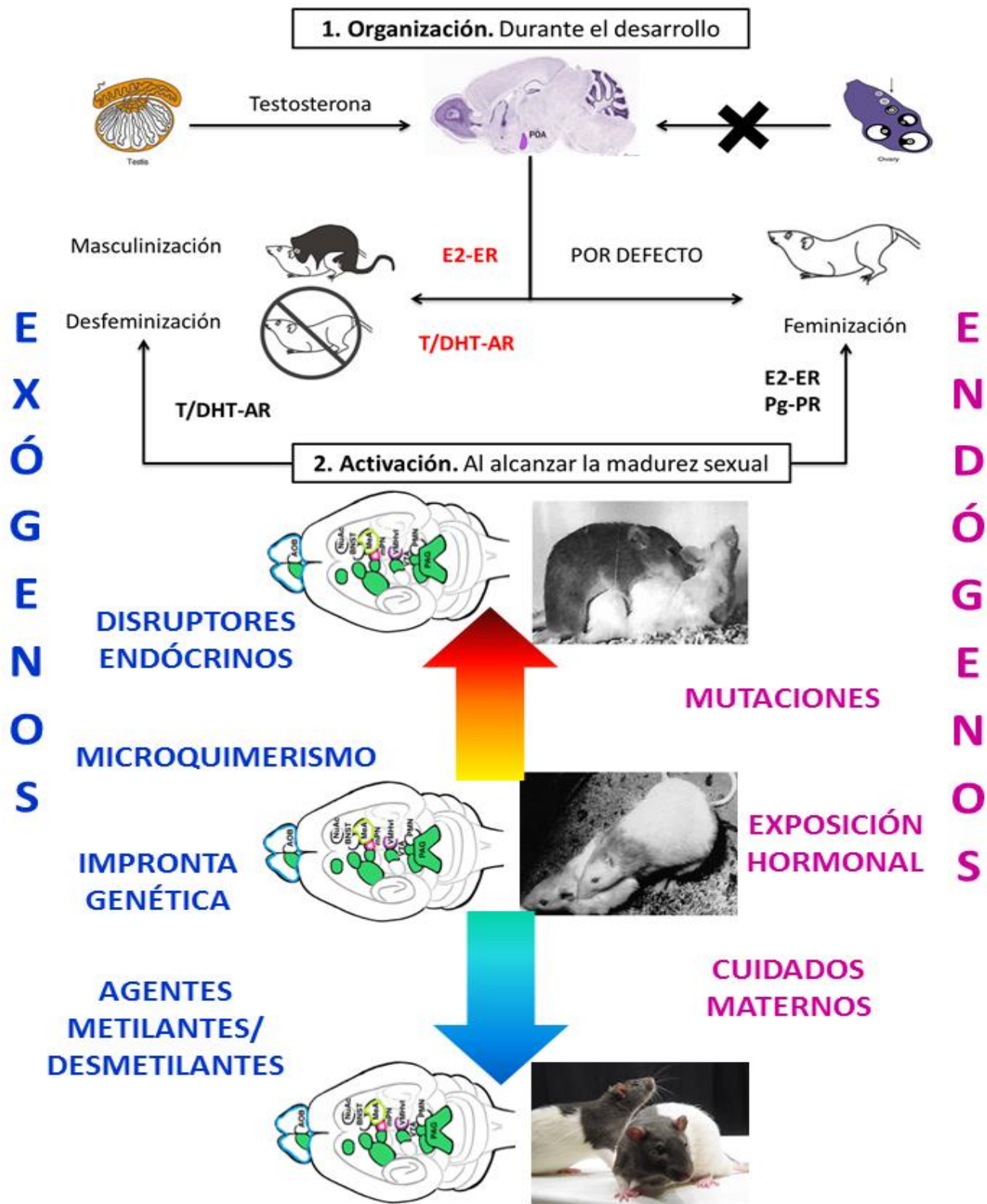
Dadas las complicaciones de los estudios en humanos, la propuesta ontogénica-epigenética ha sido probada en diferentes modelos animales, en los que se ha demostrado que, efectivamente, hay mecanismos epigenéticos implicados en la diversidad de la conducta copulatoria<sup>30,62,67-69</sup>. Un estudio realizado en 2015 demostró que la masculinización del cerebro requiere de la desmetilación activa de diversos genes en el área preóptica de la rata para que sea desplegada la conducta copulatoria masculina en los machos adultos<sup>69</sup>. Cuando se inhibió farmacológicamente en las crías hembras a las DNA metil-transferesas, las enzimas encargadas de catalizar la reacción de metilación de las citosinas del ADN, fuera del periodo crítico de desarrollo del cerebro, se observó un efecto masculinizante de la conducta copulatoria tras la ovariectomía y administración de testosterona en las hembras adultas. En efecto, hay bastante evidencia científica de los efectos que tienen las diferentes marcas epigenéticas, principalmente la metilación de las citosinas, sobre la conducta sexual en aves<sup>70,71</sup>, peces<sup>72</sup> y mamíferos<sup>73-77</sup> durante el desarrollo o en el organismo adulto.

Existen otros procesos biológicos en los que aún falta profundizar para comprender su implicación en la conducta sexual. Tal es la impronta genética, una forma de regulación génica que favorece la expresión de un solo alelo de origen materno o paterno para ciertos genes a través de diversos mecanismos epigenéticos, principalmente mediante la metilación del ADN<sup>78-81</sup>. Si bien ocurre en menos del 1 por ciento del genoma en mamíferos, los genes improntados tienen funciones reguladoras durante el desarrollo embrionario y en el cerebro post-natal. Se ha encontrado una expresión génica diferencial entre alelos de origen materno y paterno en diversas regiones como el sistema límbico, hipotálamo y corteza en genes que mantienen y regulan los circuitos neuronales asociados con conductas sociales y motivacionales<sup>79,81</sup>. Por ejemplo, la pérdida de la expresión materna del gen *Phlda2* en crías de ratón produce un incremento en la conducta materna como el acicalamiento en las madres del tipo silvestre. Otro ejemplo es la pérdida de la expresión paterna en los genes *Peg3* o *Magel2* que conlleva a una disminución de neuronas oxitocinérgicas en el hipotálamo. Considerando la diversidad conductual, se reportó que los ratones con delección del gen materno *Nesp* muestran mayor número de decisiones impulsivas que sus contrapartes del tipo silvestre, mientras que los ratones que carecen del gen paterno *Grb10* exhiben menos, manteniendo una conducta opuesta con dos genes improntados que tienen un patrón de expresión similar en el cerebro<sup>81</sup>. Si la

impronta genética diferencial tiene injerencia sobre la conducta sexual, es algo que aún no se ha respondido, pero tampoco es improbable dada su relación con otras conductas que han demostrado ser susceptibles a la modulación por genes improntados.

Otro fenómeno a considerar es el microquimerismo, que es la persistencia de células o material genético ajenos a un organismo. Se ha reportado que la transmisión puede ocurrir por diversas vías, pero la mejor documentada es durante el embarazo, cuando las células o ADN fetales son transferidas a la madre, a este proceso se le denomina microquimerismo fetal masculino y ha demostrado tener implicaciones en procesos autoinmunes y posiblemente en la prevalencia de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer<sup>82,83</sup>. Adicionalmente, se ha observado que estas células y ADN exógenos pueden integrarse, mantenerse funcionales en diversos tejidos y formar parte de los nichos celulares en el cerebro<sup>83</sup>. Hasta ahora no hay estudio alguno que relacione el microquimerismo con el aspecto conductual, pero si consideramos que células y ADN de origen masculino pueden integrarse a los nichos celulares que conforman diferentes circuitos neurales o bien, que podrían modificar la impronta genética que los regula, definitivamente, el microquimerismo es un fenómeno a tener en cuenta cuando hablamos de los posibles orígenes biológicos de la diversidad de la conducta sexual.

Como conclusión, la diversidad de la conducta sexual difícilmente podría tener un único origen, sino que más bien apunta a que es el producto de una serie de factores biológicos (entre otros) que influyen de manera particular en la ontogenia de cada individuo y que ocurren de manera natural sin que se pueda tener un registro o control de todos aquellos factores que estructuran y determinan la conducta sexual. No obstante, muchos de estos factores no han sido tomados en cuenta para tratar de comprender el origen de la diversidad de la conducta sexual, lo que ha llevado a indagar en nuevos paradigmas que puedan empatar la variación conductual con los factores que pueden influir en ella. La figura 2 esquematiza las propuestas descritas sintetizándolas de acuerdo a la participación endógena o exógena en la diversificación de la conducta sexual



**FIGURA 2. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA DIVERSIDAD DE LA CONDUCTA SEXUAL.** Diversos factores endógenos y exógenos pueden contribuir a la diversidad de la conducta sexual desde la diferenciación sexual del cerebro en etapa perinatal hasta la madurez sexual cuando el circuito es activado por medio de las hormonas sexuales. La diversidad está sujeta a las señales endógenas y exógenas que recibe cada individuo durante su trayectoria ontogénica particular.

#### *Capítulo 4. Limitaciones en los estudios de la diversidad de la conducta sexual*

Hasta este punto, el marco teórico ha abordado la diversidad de la conducta sexual desde la perspectiva del modelo categórico (endofenotipos), que fue planteado en principio y por lo tanto, ha sido el más estudiado; sin embargo, la información previamente presentada demuestra que su principal limitación es que restringe la diversidad de la conducta sexual a algunas categorías o endofenotipos, lo cual impide observar de manera completa el fenómeno. Esta limitación ha tenido consecuencias, pues al hablar de categorías, se establecen características particulares en los individuos que pertenecen a cada una, de manera que los sujetos que no corresponden con alguna de ellas son descartados; o bien, siendo categorías muy amplias como en el caso de los machos copuladores, se subestiman las diferencias intra-categóricas que dan lugar a la diversidad. Adicionalmente, el paradigma categórico queda limitado ante la evidencia reciente acerca de la regulación epigenética, la impronta genética y el microquimerismo, que podrían estar contribuyendo a la divergencia conductual dentro de un mismo endofenotipo.

Dado que la diversidad de la conducta sexual se hace cada vez más patente, se ha cuestionado la validez del paradigma categórico desde su origen en la dicotomía de los cerebros masculino y femenino señalando a que podrían no ser tan diferentes como se había planteado. En un estudio en 2015 realizado por Joel y colaboradores se analizó la consistencia de las diferencias entre el cerebro masculino y femenino<sup>13</sup>. En 169 mujeres y 112 hombres midieron el volumen de materia gris de 116 regiones del cerebro consideradas sexualmente dimórficas, de las cuales únicamente 10 mostraron un dimorfismo sexual, mientras que las demás resultaron no tener una diferencia significativa entre hombres y mujeres. Además, el análisis individual de los sujetos exhibió que en cada cerebro, las diferentes regiones analizadas presentan un patrón particular de volumen de materia gris que puede caer dentro de la categoría femenina o masculina independientemente de si se trata del cerebro de un hombre o de una mujer. Es decir, el cerebro humano funciona como un mosaico en el que cada una de las regiones que lo conforman presenta características masculinas o femeninas tal que constituyen un patrón individual para cada sujeto. Esta propuesta permite integrar los diferentes factores biológicos que podrían incidir en la diversidad sexual, ya que en las regiones anatómicas que conforman los circuitos comprometidos en la conducta sexual podría predominar el efecto de uno o varios

factores endógenos o exógenos que promuevan una divergencia ontogénica regionalizada y que en conjunto, daría lugar a una configuración individual única en correspondencia a una conducta sexual particular, asumiendo que existe dicha correspondencia.

Un aspecto más que se ha omitido en muchos de los estudios de la conducta sexual y particularmente en los que atañen a la conducta copulatoria masculina es la plasticidad del cerebro, de los circuitos que integran la conducta sexual y de la forma como éstos se desarrollan. Al respecto, se ha propuesto que contrario a la concepción tradicional de un modelo dual en el que las hormonas sexuales son responsables de inducir el desarrollo de dos circuitos independientes: uno que conlleva a la conducta sexual masculina y otro a la femenina, el modelo de la vía común plantea que ambas conductas pueden ser expresadas dependiendo de los estímulos externos<sup>16</sup>. En este modelo, los núcleos que integran la conducta sexual masculina (MPOA) y la femenina (VMH) actúan juntos de manera antagónica suprimiendo una conducta y favoreciendo la otra en respuesta al contexto exterior, lo cual admite la flexibilidad y adaptabilidad conductual en respuesta al ambiente.

El modelo de la vía común y el modelo del mosaico nos permiten vislumbrar la conducta sexual como un fenómeno continuo, similar al que planteó Alfred Kinsey para la orientación sexual en la década de los 50s, en el que los extremos están completamente separados, pero en medio hay una diversidad con límites difusos<sup>10</sup>. Estos modelos también comulgan con la propuesta de Richard Whalen que sugiere que en vez de que la conducta sexual femenina y la masculina ocupen extremos opuestos, conforman dos dimensiones en las que se puede situar el grado de masculinidad o feminidad<sup>84</sup>. Por lo tanto, la conducta sexual no podría ser agrupada o categorizada de manera definida, sino que estaríamos estudiando un fenómeno individualizado, según el modelo del mosaico y gradual o continuo, de acuerdo con el modelo de la vía común. Sin embargo, continúa en discusión la contraposición de estas propuestas con el planteamiento categórico, a pesar de la evidencia que apunta a que podría carecer de la consistencia suficiente para clasificar de forma delimitada la conducta sexual.

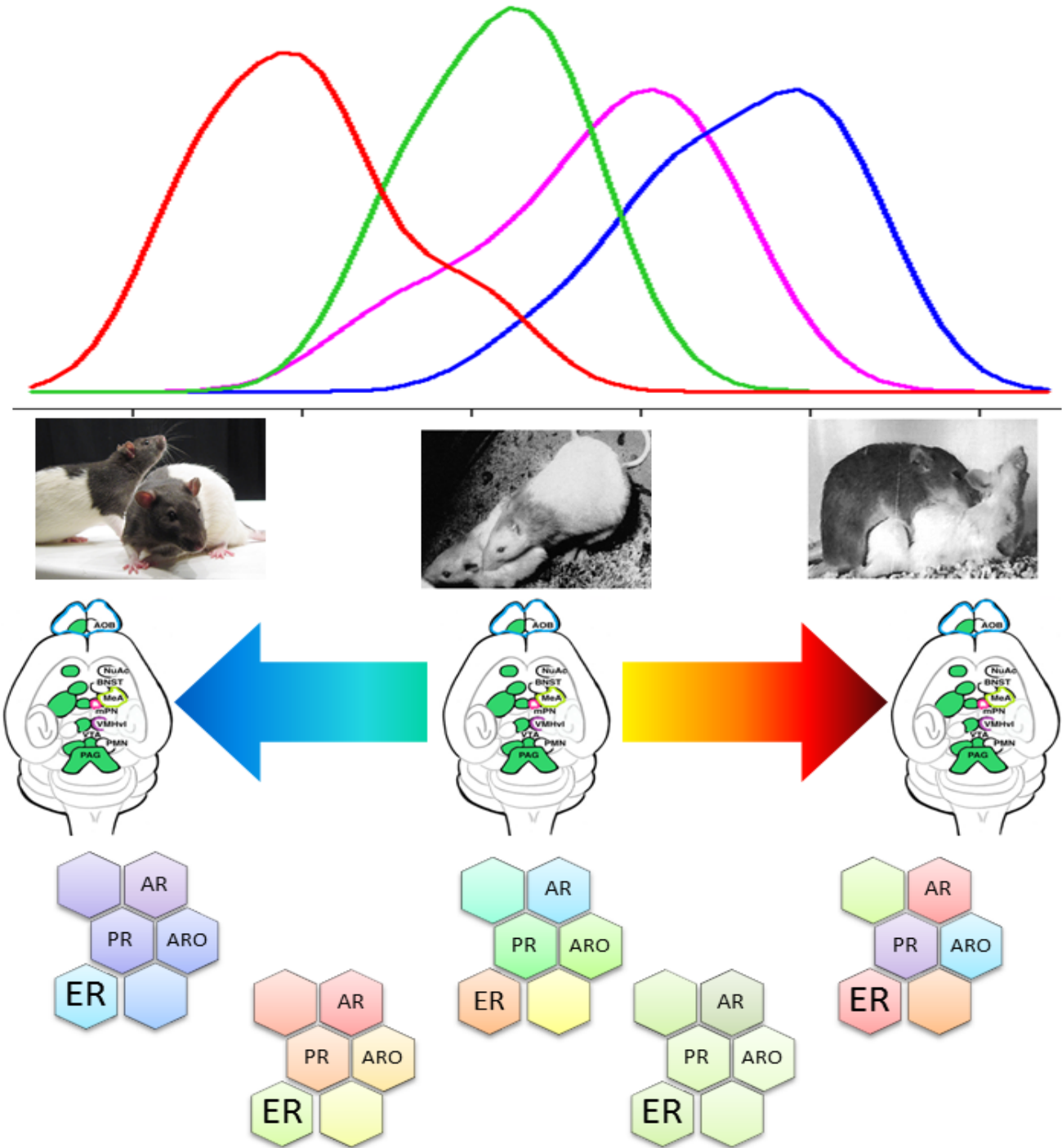
## ***Capítulo 5. La diversidad de la conducta copulatoria de la rata macho como un mosaico individual de parámetros conductuales indeterminado por endofenotipos.***

Considerando la evidencia presentada en los capítulos anteriores de que el modelo categórico de la diversidad de la conducta sexual no permite la apreciación de la variación conductual que se ha observado bajo diferentes contextos y considerando que existen múltiples factores que podrían estar interviniendo en diversificar la conducta sexual, se ha cuestionado y desafiado experimentalmente el paradigma categórico, con lo que se ha obtenido evidencia que lo confronta. Por ejemplo, se ha demostrado que el cerebro humano tiene características intersexuales y que más que un sistema dicotómico, se trata de un solo circuito compartido para la conducta sexual masculina y femenina en el que se suprime y activa una u otra en adaptación al ambiente<sup>11,12,16,85-88</sup>. Proponemos que la diversidad de la conducta copulatoria de la rata macho cumple dos aspectos, el primero, es que de manera similar al mosaico de características masculinas y femeninas en el cerebro humano, la conducta copulatoria de la rata macho es un mosaico de características conductuales de los diferentes endofenotipos y que no corresponde a un patrón morfo-funcional específico, aquí evaluado a través de los niveles de expresión génica relativa en algunas áreas límbicas de interés sexual.

Además, consideramos que dado que la categorización por endofenotipos se basa en un solo parámetro de conducta copulatoria, ya sea la latencia o frecuencia de eyaculación, el resto de los parámetros también tendrían que ser específicos de cada endofenotipo, de otro modo, éstos carecen de la consistencia para clasificar la diversidad de la conducta copulatoria. Así, lo segundo que planteamos, es que los endofenotipos pierden los límites entre uno y otro, en congruencia con la concepción del continuo sexual aplicado a la conducta copulatoria de la rata macho, en donde cada endofenotipo representa un área dentro de la escala con individuos que se dispersan en las áreas correspondientes a otros endofenotipos con los que comparten características conductuales. Por lo tanto, los machos que pertenecen a una misma categoría conductual no pueden compartir características neurobiológicas generales. La figura 3 esquematiza esta propuesta: curvas de los parámetros de conducta copulatoria con medias categóricas diferentes, pero que se traslapan unas con otras en independencia a los patrones de expresión génica en diferentes áreas del sistema límbico.



# CONDUCTA COPULATORIA INTER-CATEGÓRICA



## PATRONES DE EXPRESIÓN GÉNICA INDIVIDUALES

**FIGURA 3. LA CONDUCTA COPULATORIA ES UN MOSAICO INDIVIDUAL DE CARACTERÍSTICAS INTER-CATEGÓRICAS.** Proponemos que cada macho tiene patrones conductuales y de expresión génica particulares e inter-categoricos, por lo que no hay consistencia en los edofenotipos. Como fenómeno, la conducta copulatoria opera como un continuo donde solo los individuos de los extremos tendrán características completamente diferentes.

En síntesis, el modelo propuesto establece que 1) individualmente, la conducta copulatoria de la rata macho opera como un mosaico que combina parámetros de conducta copulatoria de diferente magnitud en independencia a la frecuencia y/o latencia de eyaculación. Es decir, aunque un macho presente un gran número de eyaculaciones podría mantener también un número de motas muy reducido, comparable con las que presentan los copuladores lentos. Mientras que 2) a nivel poblacional, la conducta copulatoria de la rata macho se observa como un fenómeno continuo en el que este mosaico conductual ocurre de manera gradual y sin delimitaciones endofenotípicas, sino que los patrones conductuales individuales se dispersan en todas las posibles combinaciones, donde algunos machos presentarán una conducta copulatoria similar, pero otros se alejan del común hacia los patrones conductuales extremos. Esta propuesta aporta un enfoque de plasticidad y diversidad regionalizada en donde uno o varios factores de divergencia ontogénica o del contexto ambiental, en combinación, pueden participar para promover un patrón estructural único que distingue la conducta sexual individualmente, pero que no correlaciona con algunas variables biológicas particulares, como plantean los endofenotipos, ya que esto implica que diferentes trayectorias ontogénicas redundan en los mismos patrones morfo-fisiológicos.

Nuestro planteamiento comulga con que la diversidad ontogénica conforma la diversidad fisiológica que finalmente da lugar a la diversidad conductual; sin embargo, el alcance se haya limitado por la capacidad de seguimiento individual, pues si para cada organismo hay una trayectoria ontogénica única, cada sujeto en una población tendría que ser analizado de forma particular durante su desarrollo. Pese a esta limitación, las herramientas de análisis matemáticos multivariados nos permiten simplificar el fenómeno ya no de forma categórica, sino a través de los parámetros de conducta copulatoria que tienen mayor peso sobre la diversidad del fenómeno<sup>89,90</sup>. El trabajo que publicamos describe de manera individual la conducta copulatoria de la rata macho mediante un análisis factorial que reduce los parámetros de conducta copulatoria en dos dimensiones representadas como ejes de forma gráfica; con lo que analizamos en conjunto todos los parámetros de conducta copulatoria de la rata macho de acuerdo a la variabilidad presentada en nuestra muestra. Asimismo, con ayuda de este tipo de análisis, se pueden diseñar estudios en las poblaciones silvestres y humanas para explorar con mayor detalle cómo ocurre el fenómeno de la diversidad de la conducta sexual.

# JUSTIFICACIÓN

---

La diversidad de la conducta sexual puede ser descrita mediante dos paradigmas opuestos, uno de tipo categórico y delimitado y el segundo, individualizado y continuo; cada uno tiene una concepción y consecuencias diferentes sobre el conocimiento de la diversidad sexual, siendo un aspecto fundamental el impacto que tiene sobre la selección sexual y reproducción de las especies, es necesario abordarlo desde la concepción más acertada al fenómeno biológico contemporáneo. Aunado a esto, en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de afecciones sexuales masculinas en humanos, los estudios pre-clínicos utilizan el modelo de la rata macho a través de endofenotipos clasificados por la latencia de eyaculación sin realizar un análisis minucioso de los diferentes parámetros de conducta copulatoria, lo cual podría conducir a conclusiones imprecisas o ceñidas a condiciones muy particulares cuando los estudios llegan a fase clínicas, principalmente, en la variabilidad de efectos observados y con ello, disminuir la eficacia y consistencia de un tratamiento farmacológico.

Además, el estudio de la diversidad de la conducta sexual también aporta e impacta en el contexto social, ya que en la actualidad, la conducta sexual humana demuestra una pluralidad tal que las posibles clasificaciones que se plantean han sido insuficientes para describir e identificar las diferentes manifestaciones sexuales en la población. Este hecho promueve una disputa constate en la que participan diferentes grupos sociales y políticos buscando acuerdos que permitan una inclusión objetiva y desde el marco científico que contribuya a romper los prejuicios arraigados que existen en torno a la diversidad de la conducta sexual, por lo que su estudio de forma multidisciplinaria es indispensable para generar y difundir el conocimiento que nos lleve a comprender la naturaleza del fenómeno de la diversidad sexual.

# HIPÓTESIS

---

1. Si la diversidad de la conducta copulatoria de la rata macho se segrega en diferentes endofenotipos según la frecuencia o latencia de eyaculación, entonces los patrones de monta, intromisión y eyaculación son particulares para cada endofenotipo.
2. Dado que los diferentes endofenotipos copulatorios de la rata macho mantienen una relación categórica con los niveles de expresión génica de AR, ESR1, PR y aromatasa en AMG, BO, MPOA e VHM, los niveles de expresión de dichos genes es similar e invariante dentro de un mismo endofenotipo.

# OBJETIVOS

---

## **Objetivo general.**

Asociar los patrones de conducta copulatoria de los diferentes endofenotipos en la rata macho con los niveles de expresión génica de AR, ER- $\alpha$ , ER- $\beta$ , PR, aromatasa, Dnmt1 y Dnmt3a en BO, AMG, VMH y MPOA.

## **Objetivos particulares.**

1. Registrar las frecuencias y latencias de los patrones de monta, intromisión y eyaculación de las ratas macho mediante 6 pruebas copulatorias monoándricas semanales de 30 minutos cada una.
2. Describir en conjunto las variables de las frecuencias y latencias de los patrones de monta, intromisión y eyaculación de una muestra de ratas macho clasificadas categóricamente de acuerdo a su frecuencia de eyaculación mediante el análisis por componentes principales.

3. Evaluar los patrones de expresión génica de AR, ESR1 (ER- $\alpha$ ), PR, Dnmt1, Dnmt3a y aromatasa en BO, AMG, VMH y MPOA por PCR cuantitativa de las ratas macho identificadas de acuerdo a su comportamiento sexual.
4. Establecer una asociación entre los patrones de conducta copulatoria de la rata macho y los niveles de expresión génica evaluados en (3) utilizando el algoritmo de agrupación por mínima similitud.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### ➤ *Manejo de animales.*

Utilizamos un total 50 ratas macho de entre 90 y 120 días de edad (250-300 gramos de peso) y 40 ratas hembra de la misma edad (200-250 gramos de peso) de la colonia singénica Wistar de la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, donde se alojaron en un cuarto de ciclo invertido con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad con alimento estándar y agua *ad libitum*. Las hembras fueron ovariectomizadas bilateralmente bajo anestesia general con tribromoetanol a una dosis de 300 mg/Kg de peso por vía intraperitoneal, tras una semana de recuperación, se les administró por vía subcutánea una dosis de 25 ug de benzoato de estradiol disuelto en aceite de maíz y posteriormente, cada 48 horas. El día de las pruebas conductuales, se indujo la receptividad mediante la administración de 1 mg de progesterona 3-4 h antes de exponerlas a los machos. Todos los animales manipularon y mantuvieron de acuerdo a los procedimientos aprobados por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales del Laboratorio (CICUAL) del IIB.

### ➤ *Pruebas conductuales y clasificación en endofenotipos.*

Las pruebas de conducta copulatoria se realizaron semanalmente con 5 machos por día en encuentros individuales con una hembra diferente y receptiva por inducción hormonal. En un redondel de acrílico de 90 x 90 cm se dejó aclimatar por 5 minutos a un macho identificado y pasado este lapso, se introdujo a una hembra receptiva también identificada. Se tomó el registro

individual de la hora de comienzo de prueba, la hora de término después de 30 minutos de observación, la identificación de la hembra con la que se llevó a cabo la prueba, así como los patrones de frecuencia y latencia de monta, intromisión y eyaculación. La siguiente prueba se realizó al día siete posterior a la primera y de manera subsecuente hasta completar 6 pruebas para proceder a agrupar la muestra de machos de acuerdo a la latencia de eyaculación promedio de todas las series eyaculatorias ejecutadas en todas las pruebas, EL: *rapid* (EL <300 segundos), *normal* (EL 300-600 segundos), *slow* (EL >600-900 segundos) o *sluggish* (EL >900 segundos). También se utilizó como criterio de clasificación el número acumulado de eyaculaciones presentadas en las 6 pruebas copulatorias o frecuencia de eyaculación, EF: *very high* (VH;  $\geq 20$  eyaculaciones), *high* (H; 16-19), *average* (AV; 11-15), *low* (L; 6-10) y *very low* (VL; 1-5).

### ➤ ***Disección de áreas del sistema límbico.***

Una semana después de la sexta prueba, los machos fueron sacrificados por decapitación, previa anestesia con pentobarbital a una dosis de 200 mg/Kg de peso administrada por vía intraperitoneal. Se disecó rápidamente el cerebro en una cama de hielo seco y se realizaron los cortes con una navaja quirúrgica de acuerdo a la figura 4 basada en las referencias anatómicas del Atlas Praxinos para obtener las áreas cerebrales de interés: bulbo olfatorio, amígdala, área preóptica e hipotálamo ventromedial de acuerdo al método implementado por Paredes y colaboradores<sup>38</sup>. Las regiones de interés fueron inmediatamente introducidas y congeladas en microtubos estériles de 1.5 ml con 200  $\mu$ l de TRIzol, para posteriormente, en un plazo no mayor a 1 semana, se realizara la extracción de RNA de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Se corrió un gel de agarosa 1% para asegurar la integridad del RNA y se cuantificó espectrofotométricamente antes de realizar la conversión a cDNA con la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina moloney (M-MLV RT) de Promega con 2  $\mu$ g de RNA, 50  $\mu$ M de oligo dT, 1.2 mM de *random primers* y se llevó a un volumen de 15  $\mu$ l con agua libre de RNAsas, de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Los tubos de reacción fueron calentados a 65°C por 5 minutos y luego enfriados en hielo para añadir 10  $\mu$ l de la mezcla de dNTP 10 mM, solución amortiguadora, 200 U de la enzima y agua libre de RNAsas para llevar a un volumen total de 25  $\mu$ l. Los tubos de reacción se llevaron a 25°C por 10 minutos y las

condiciones de síntesis fueron a una temperatura de 55°C durante 30 minutos. Las muestras de cDNA fueron almacenadas a -20°C hasta realizar los ensayos para determinar la expresión de los genes de interés mediante PCR cuantitativa.

### ➤ *Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.*

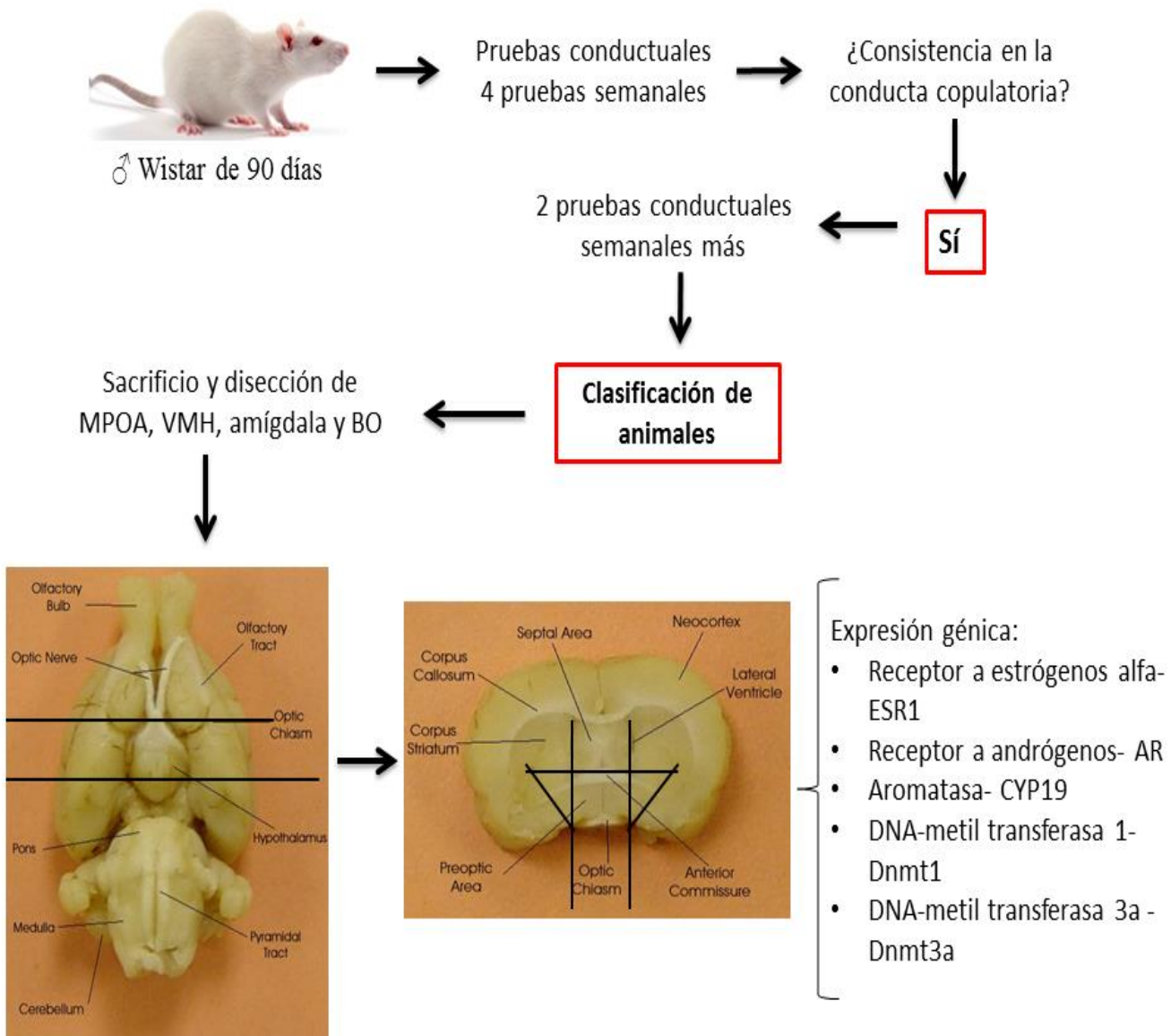
Los resultados de expresión génica relativa se obtuvieron utilizando la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) con la química de reacción con sondas de hidrólisis en el equipo Roche LightCycler 480, mediante el método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ <sup>91</sup>. Como grupo de referencia, se utilizó una muestra en pool compuesta de 3 µl de cDNA de cada sujeto de estudio para cada una de las áreas de interés del sistema límbico: amígdala, bulbo olfatorio, área preóptica medial e hipotálamo ventro-medial. Los oligonucleótidos cebadores para la PCR cuantitativa fueron diseñados por el software ProbeFinder de Universal Probe Library con el número de acceso a los genes de interés. El gen constitutivo fue determinado mediante el software NormFinder como se había reportado previamente<sup>38</sup>, el gen codificante para la subunidad z de la proteína de activación de tirosina 3-monooxigenasa/triptófano 5-monooxigenasa (Ywhaz). Utilizamos un volumen total de 10 µl por reacción que contenía 2 µl de cDNA, 300 nM de oligonucleótidos cebadores (T4 oligo), 5 µl de LightCycler 480 Probes Master 2X (Roche), 1 µM de sonda de hidrólisis (Roche) y agua grado Biología Molecular. En cuanto a los genes de interés, ESR1 (ER- $\alpha$ ), AR, aromatasa (CYP19) y Dnmt1, amplificaron eficientemente a 60°C, mientras que Dnmt3a y PR tienen una mejor eficiencia de amplificación a 58°C. Las condiciones de amplificación son sintetizadas en una tabla en el anexo 2.

### ➤ *Análisis estadístico.*

Los resultados de conducta copulatoria se obtuvieron a partir de dos muestras de 25 animales cada una para tener un total de 50 (n=50). Mediante 6 pruebas copulatorias, para cada sujeto de estudio, se registraron los parámetros de latencia de monta, intromisión y eyaculación, que se presentan como la media de los valores obtenidos en todas las series eyaculatorias registradas; así como el número acumulado de montas, intromisiones y eyaculaciones ejecutadas en todas las pruebas. Se evaluó la distribución de la muestra para los parámetros copulatorios mediante histogramas de frecuencia absoluta con su respectiva curva de densidad de probabilidad y se

aplicó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk (Fig. Sup. 1); los parámetros de latencia de eyaculación y latencia de intromisión no pasaron la prueba de normalidad ( $p < 0.05$ ), por lo que para las comparaciones posteriores se utilizaron pruebas no-paramétricas. Una vez que se realizó la clasificación de los machos en endofenotipos de acuerdo a la latencia o a la frecuencia de eyaculación, como se describió en la sección de *Pruebas conductuales y clasificación en endofenotipos*, se añadió como co-variable alguno de los parámetros que no se utilizaron como criterio de clasificación para comparar las distribuciones de densidad de probabilidad de los endofenotipos, así como su dispersión a través de gráficas de cajas y bigotes, donde los datos individuales son representados por puntos, los bigotes muestran los valores máximo y mínimo, las cajas engloban al 95% de la muestra y la barra vertical representa la media. Posteriormente, evaluamos la consistencia entre los diferentes endofenotipos mediante la prueba de Kruskal-Wallis ( $p < 0.001$ ) y para determinar las diferencias entre un endofenotipo y los endofenotipos precedente y precedente, se aplicó la prueba U de Mann-Whittney considerando un valor de p menor a 0.001. Para realizar los análisis de componentes principales, dendrogramas y el mapa de calor, los datos de conducta copulatoria y de expresión génica fueron previamente centrados y escalados y se examinó la normalidad multivariada con las pruebas de Mardia, Henze-Zurkler y Royston, de las cuales, en al menos en dos pruebas pasaron como datos normales multivariados a un nivel de significancia de  $p > 0.05$  (Figs. Sup. 2-5). El criterio de similitud utilizado en los dendrogramas fue la distancia euclidiana y el algoritmo de aglomeración fue el de mínima similitud (*complete linkage*). Para el dendrograma construido con los datos de conducta copulatoria, a un valor de similitud de 4, se contrastó en cada uno de los *clusters* obtenidos el porcentaje de individuos que pertenecen a un mismo endofenotipo con el fin de validar nuestras clasificaciones arbitrarias con la clasificación no-supervisada generada por el dendrograma. Los resultados de expresión génica se obtuvieron a partir de dos muestras con 12 animales cada una y se presentan los datos de 20 individuos ( $n=20$ ). Los gráficos de cajas y bigotes fueron realizados con el software GraphPad Prism 6, para los demás análisis y pruebas estadísticas, se utilizó R Core Team (2020) y los *scripts* utilizados están en los repositorios públicos referidos en el anexo 2.





**FIGURA 4. MÉTODO RESUMIDO.** Se llevaron a cabo dos experimentos independientes, en cada uno se realizaron pruebas de conducta copulatoria monoándricas con 25 ratas macho, todos los individuos mostraron consistencia conductual para la 4ta prueba. Tras 6 pruebas conductuales, los machos se clasificaron de acuerdo al número de eyaculaciones totales presentadas en las 6 pruebas o de acuerdo a la latencia de eyaculación promedio. El día que correspondió a la séptima prueba, se decapitaron los animales correspondientes y se extrajo el cerebro para obtener las áreas límbicas de interés según lo reportado por Antaramián A., et.al., 2015 con las incisiones señaladas en la figura. Las áreas de interés se procesaron para obtener RNA y mediante la transcriptasa inversa obtuvimos el cDNA template para realizar las reacciones de PCR cuantitativa.

# RESULTADOS

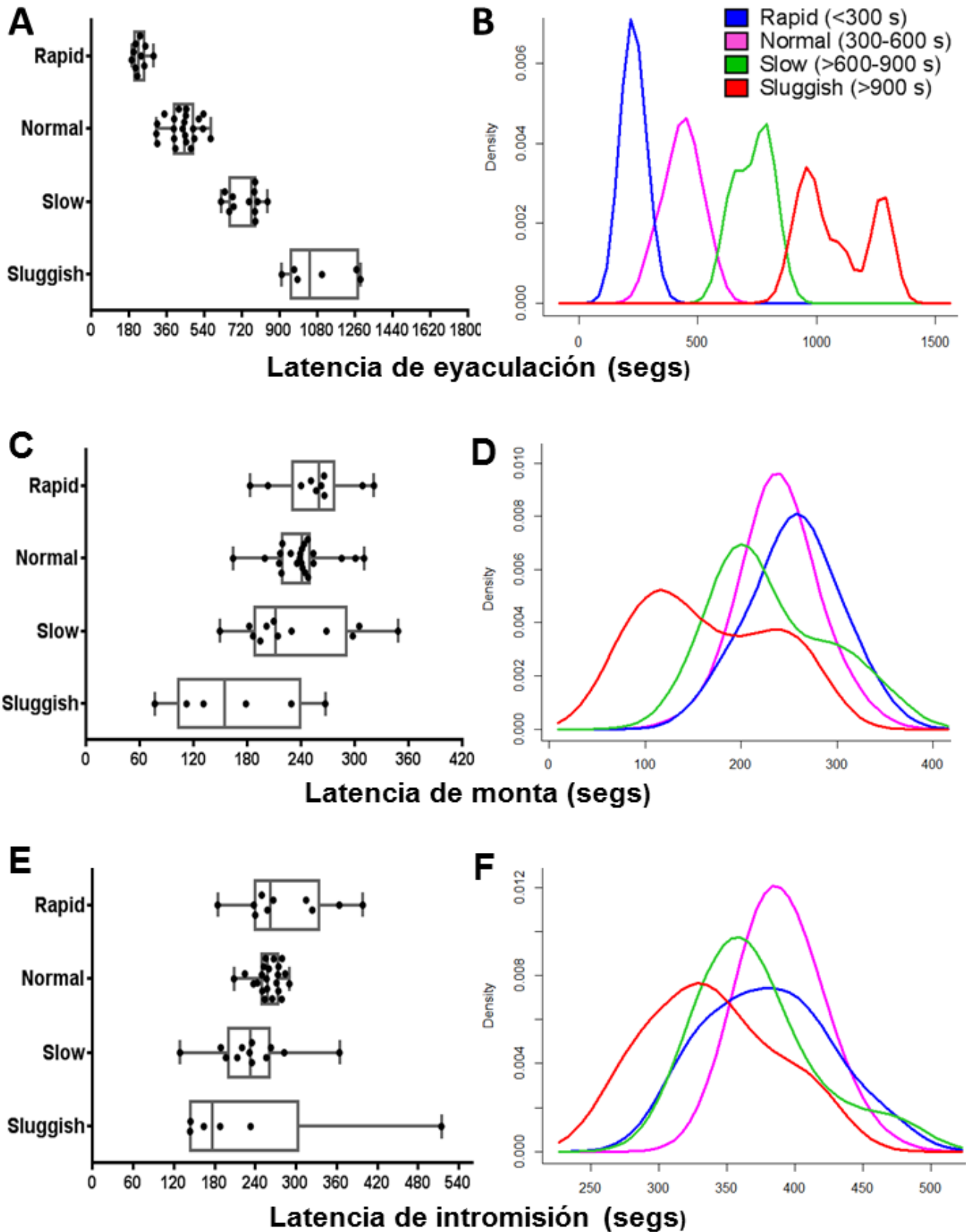
---

***Los endofenotipos por latencia y/o frecuencia de eyaculación son indistinguibles en términos de cualquier otro parámetro de conducta copulatoria.***

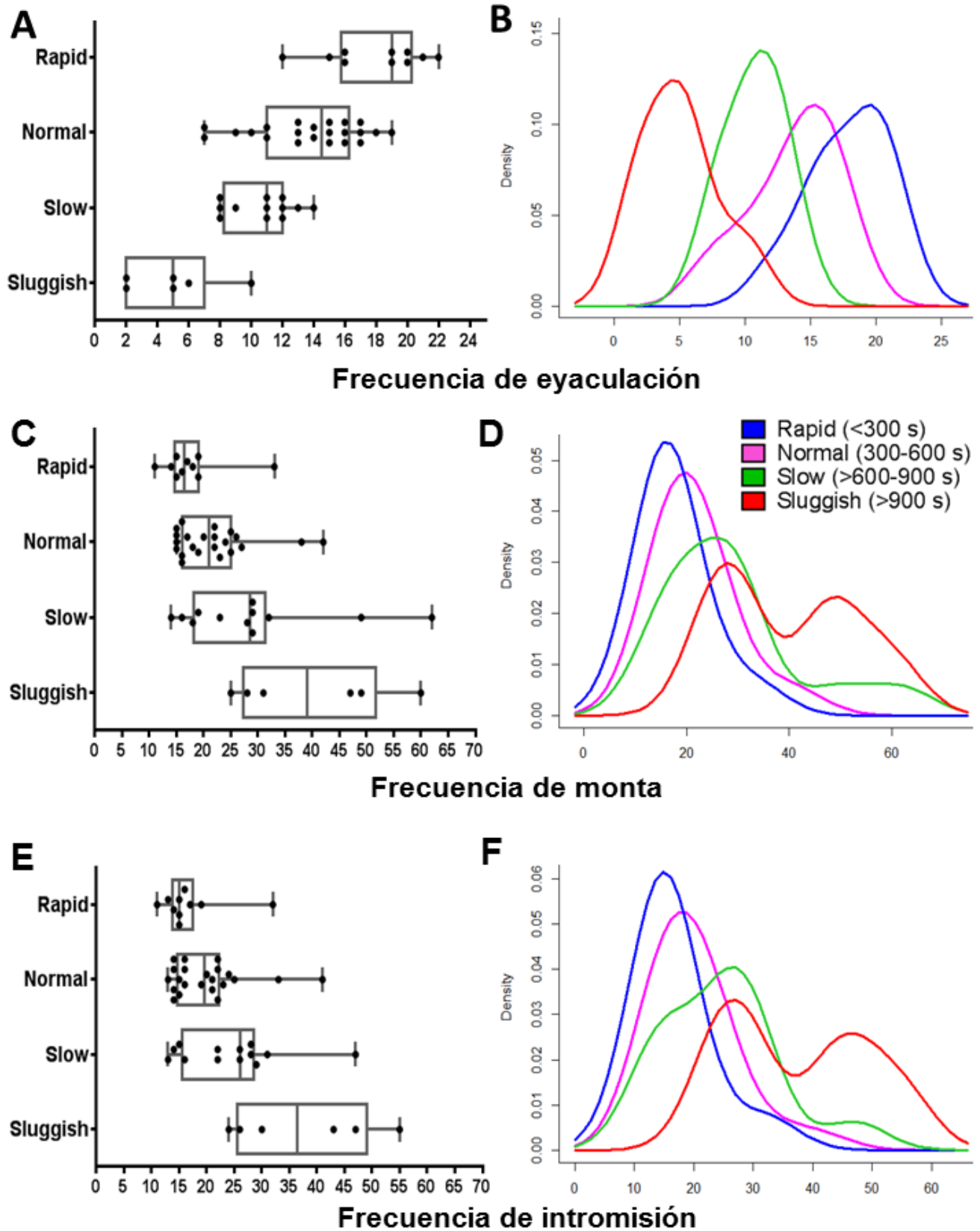
Una vez que se tuvieron los registros de las 6 pruebas copulatorias por rata macho se realizó una clasificación arbitraria de acuerdo a 1. El tiempo promedio que cada animal tardó en eyacular en todas las series eyaculatorias ejecutadas en las pruebas conductuales (clasificación por latencia de eyaculación, figuras 1 y 2) y 2. El número de eyaculaciones totales que cada animal presentó (clasificación por frecuencia de eyaculación, figuras 3 y 4), como se encuentra referido en la sección de materiales y métodos. Se ha reportado que en la rata macho, los endofenotipos copulatorios se pueden determinar de acuerdo a las diferencias en la latencia de eyaculación o en el número de eyaculaciones que se presentan individualmente. Sin embargo, para reconocerlas como grupos independientes, es necesario examinar la consistencia intra- e inter-categoría considerando todos los patrones que describen la conducta copulatoria. Para ello, analizamos las distribuciones de los endofenotipos por latencia y por frecuencia de eyaculación adicionando como co-variable alguno de los demás parámetros de conducta copulatoria que no fueron utilizados como criterio de clasificación a través de gráficas de cajas y bigotes o *boxplots* para observar los datos individuales, así como con curvas de distribución de probabilidad para examinar la uniformidad intra-categoría.

Los endofenotipos por latencia o frecuencia de eyaculación parecen categorías independientes, sin embargo, al adicionar la co-variable, se observa un traslape entre endofenotipos, es decir, comparten características de conducta copulatoria (Figs. 1-4). Esto lo corroboramos al aplicar la prueba de Kruskal-Wallis, pues hubo una diferencia significativa entre los diferentes endofenotipos, pero al aplicar la prueba U de Mann-Wittney, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre un endofenotipo y el que le precedía o procedía. Solamente las categorías de los extremos *rapid/VH* y *sluggish/VL* se mantienen completamente separadas. Estos datos demuestran que no hay consistencia inter-categoría que sustente que existen diferentes endofenotipos de acuerdo a la latencia o frecuencia de eyaculación.

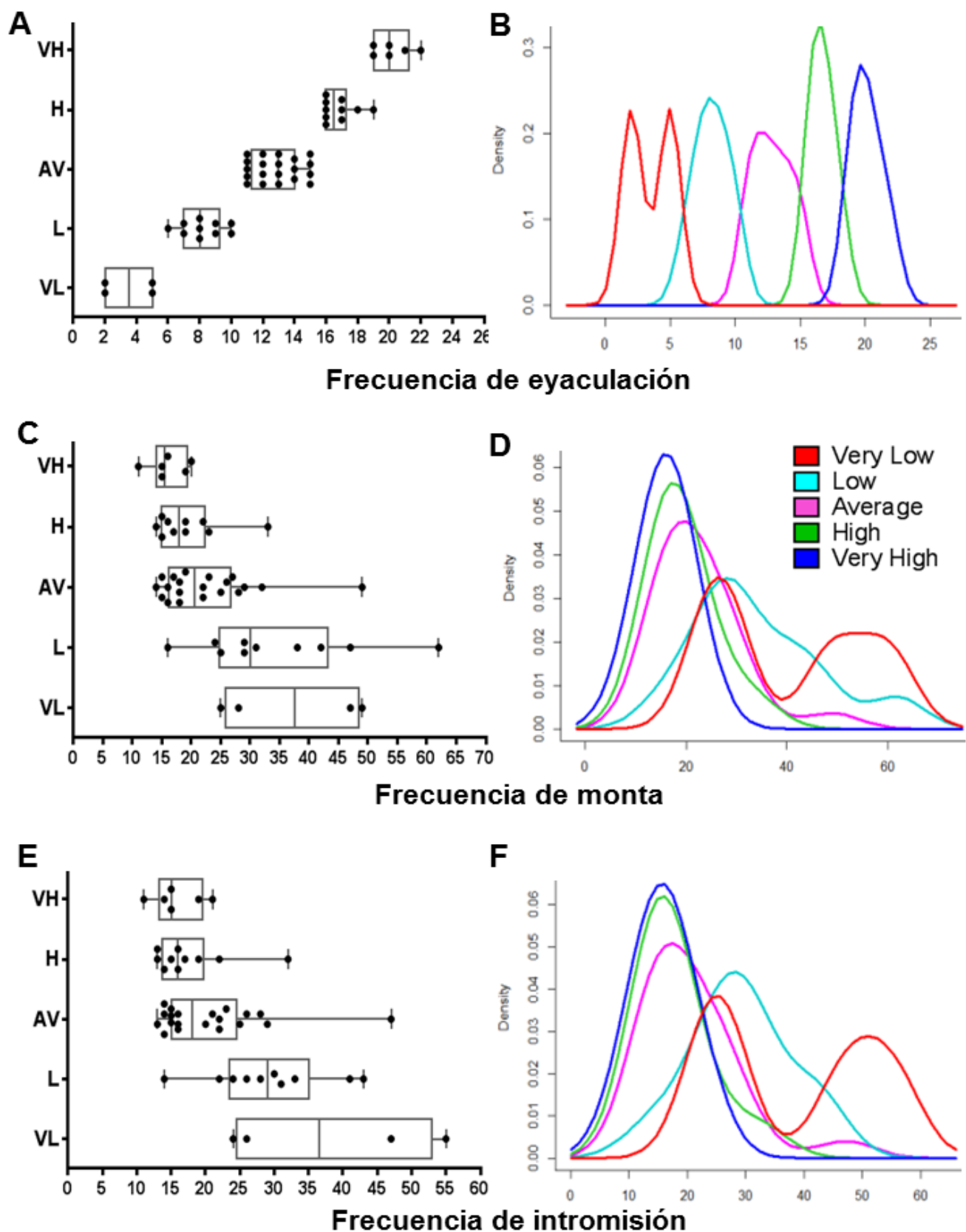
**FIGURA 1. Consistencia de los endofenotipos por latencia de eyaculación.**



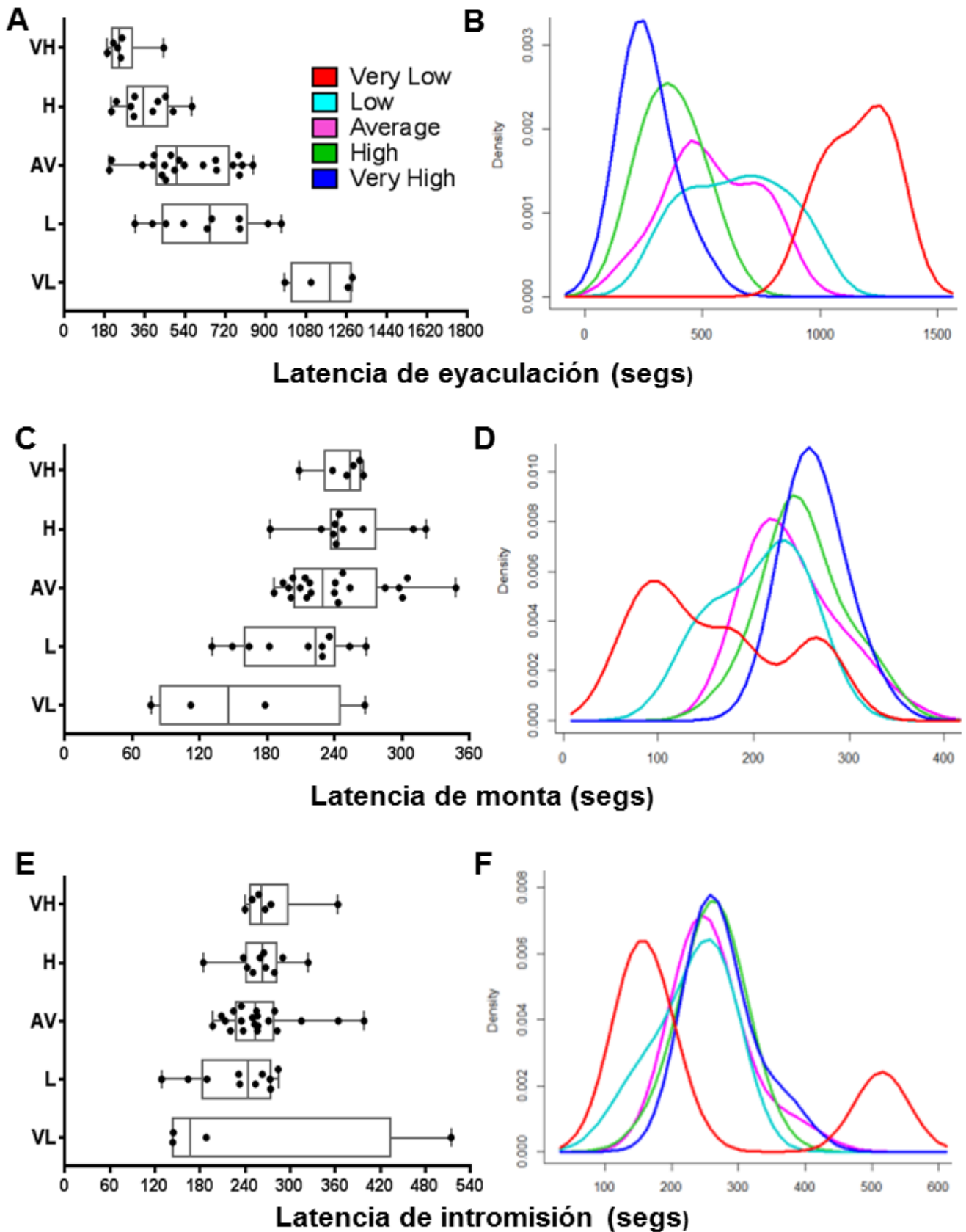
**FIGURA 2. Consistencia de los endofenotipos por latencia de eyaculación. Continuación**



**FIGURA 3. Consistencia de los endofenotipos por frecuencia de eyaculación**



**FIGURA 3. Consistencia de los endofenotipos por frecuencia de eyaculación. Continuación**



**FIGURAS 1-4. Los endofenotipos categorizados por latencia o frecuencia de eyaculación carecen de consistencia respecto a otros parámetros de conducta copulatoria.** Distribuciones de los patrones de latencia y frecuencia de monta, intromisión y eyaculación de los endofenotipos categorizados según latencia (figs. 1 y 2) y frecuencia de eyaculación (figs. 3 y 4) con datos individuales (A, C y E) representados por gráfica de cajas y bigotes donde los bigotes representan el valor máximo y mínimo, las cajas concentran el 95% de los datos, la línea vertical marca la media y cada punto es un individuo. Las curvas de distribución de densidad de probabilidad (B, D y F) muestran el comportamiento categórico por endofenotipo. Para cada patrón de conducta copulatoria distinto al parámetro de categorización se observa un traslape entre las distribuciones de diferentes endofenotipos, lo cual denota la falta de consistencia inter-categoría. Adicionalmente, la multimodalidad y las curvas platicúrticas de las distribuciones correspondientes a los endofenotipos *sluggish*/VL y *slow*/L exponen la variabilidad intra-categoría.

***La conducta copulatoria de la rata macho es un fenómeno continuo e individualizado.***

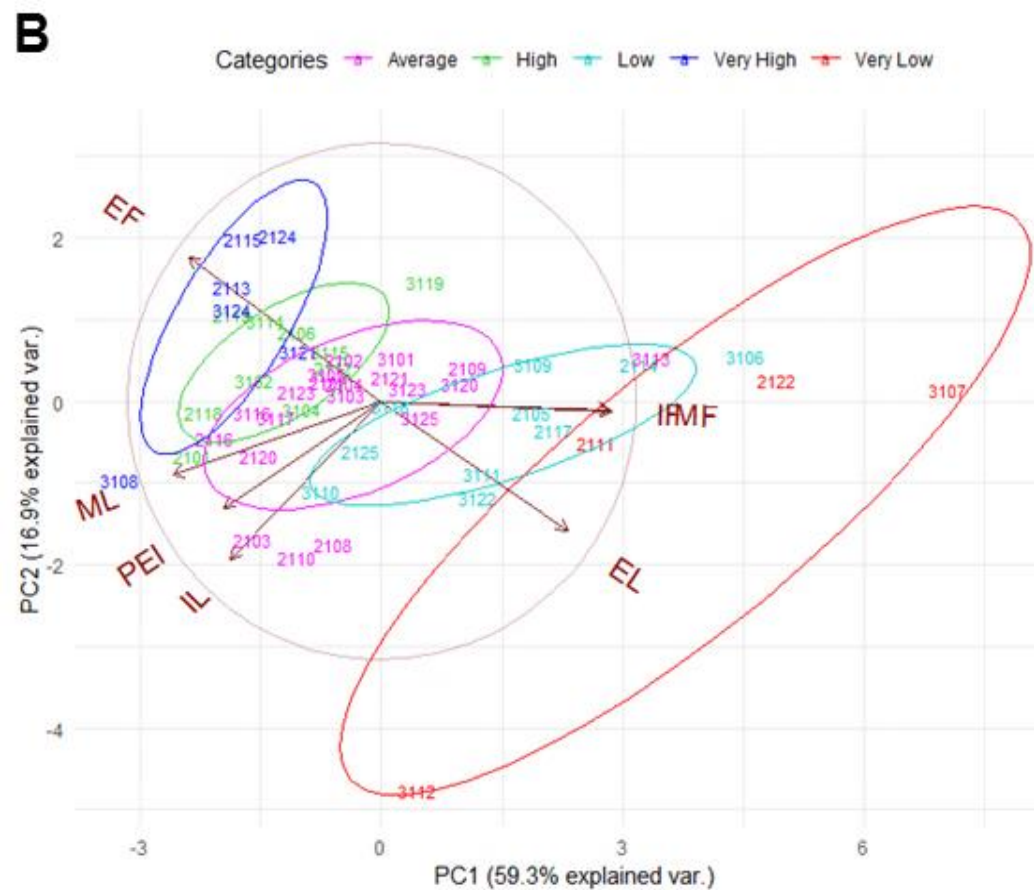
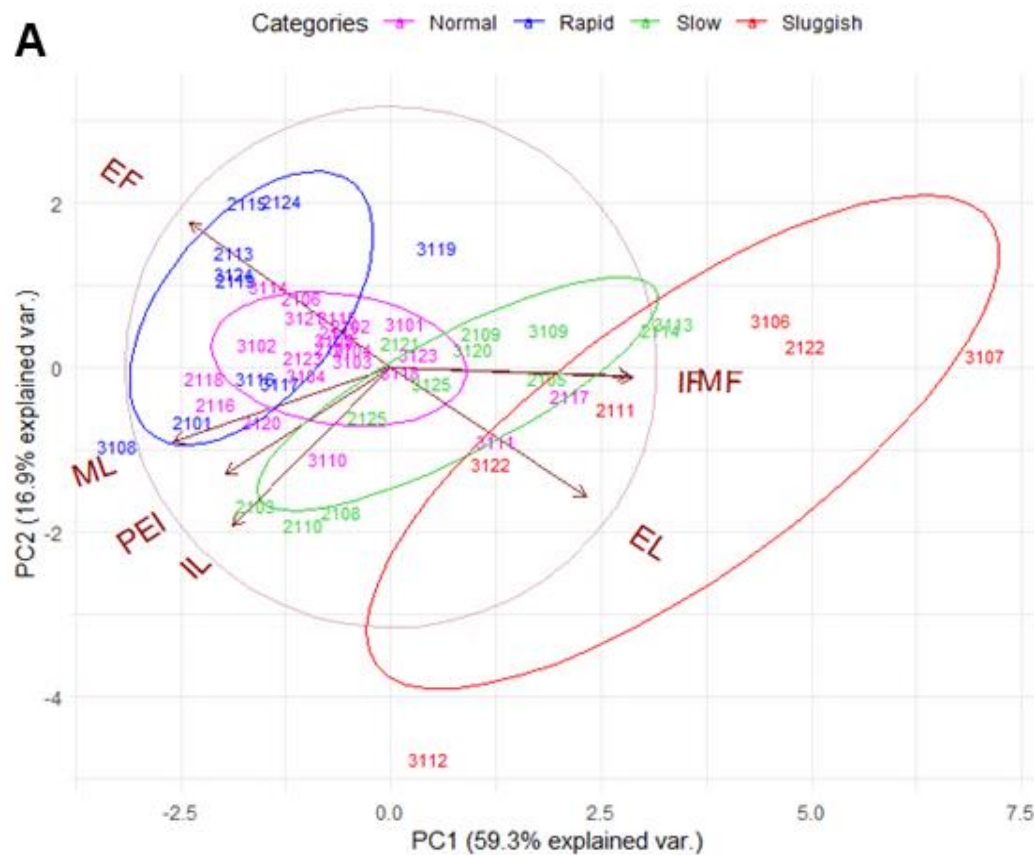
Los resultados anteriores dieron evidencia de la inconsistencia intra- e inter-categoría de los endofenotipos por latencia y frecuencia de eyaculación, por lo tanto, la diversidad de la conducta copulatoria de la rata macho no puede contenerse en los endofenotipos por latencia o frecuencia de eyaculación. Debido a ello, para explorar la diversidad de la conducta copulatoria nos valimos de los análisis multivariados que contuvieran todos los patrones motores que describen la conducta copulatoria de la rata macho. Primero realizamos un análisis por componentes principales (PCA), pues nos describe el fenómeno de manera gráfica sintetizando la variabilidad de todos los patrones de conducta copulatoria en dos componentes y al mismo tiempo nos permite observar la influencia que tienen estos patrones sobre cada macho, así como la influencia que tienen sobre cada endofenotipo.

La figura 4 contiene las gráficas bidimensionales que representan el fenómeno de conducta copulatoria de la rata macho en nuestra muestra. Se comparan las gráficas para los endofenotipos obtenidos por latencia de eyaculación (A) y por frecuencia de eyaculación (B), donde cada macho es representado con un número de identificación de cuatro dígitos. El componente principal 1 (eje horizontal) resume el 59.3% de la varianza del fenómeno, mientras que el componente principal 2 (eje vertical) resume el 16.9%, tal que los dos componentes principales contienen el 76.2% de la varianza de la muestra, es decir, el 76.2% de la

variabilidad de la conducta copulatoria es explicada por el conjunto de patrones conductuales evaluados. Las variables están representadas como vectores, entre menor es el ángulo formado entre dos vectores las variables que representan están más correlacionadas, mientras que los vectores que van en dirección opuesta indican que las variables que representan están inversamente relacionadas, como ocurre entre la latencia de eyaculación (EL) y la frecuencia de eyaculación (EF). Adicionalmente, se realizaron gráficos que complementan la información resumida en el biplot de PCA y se encuentran en las figuras suplementarias 6 y 7 del anexo 4.

En las gráficas de PCA, cada endofenotipo está englobado en elipses de diferente color en concordancia con los individuos que corresponden a cada uno, entre más grande es la elipse, hay una mayor variabilidad intra-categoría. El endofenotipo que muestra una mayor variabilidad es *sluggish*/VL, pues los individuos se encuentran más dispersos en el plano y está representado por una mayor latencia de eyaculación, dado que se ubica en el extremo positivo del vector que representa al parámetro de latencia de eyaculación (EL). En contraste, el endofenotipo del extremo opuesto, *rapid*/VH está representado por un mayor número de eyaculaciones. En congruencia con el análisis individual de los patrones de conducta copulatoria, únicamente las categorías de los extremos están totalmente apartadas, mientras que las categorías intermedias están dispersas a lo largo del eje conformado por los vectores que representan la latencia de eyaculación y la frecuencia de eyaculación, tal como ocurre en un fenómeno continuo. Esta representación gráfica nos permite analizar individualmente a cada macho identificándolo con un número de 4 dígitos en diferente color de acuerdo a su endofenotipo. Podemos observar que varios machos se dispersan en el plano alejándose de las elipses correspondientes a sus endofenotipos. Por ejemplo, los machos 3108 y 2124 pertenecen al mismo endofenotipo *rapid*/VH pero cada uno ocupa una posición diferente en el plano, de manera que el macho 3108 presenta, de manera particular, una larga latencia de monta, en tanto que el macho 2124 es representado por una mayor frecuencia de montas e intromisiones. Del mismo modo, se pueden evidenciar comportamientos similares en todas las categorías. La individualidad de la conducta copulatoria es más evidente dentro del endofenotipo *sluggish*/VL, pues aunque todos están representados por una larga latencia de eyaculación, cada animal mantiene una posición particular en el plano.





**FIGURA 4.** La conducta copulatoria de la rata macho semeja un continuo donde cada individuo es representado de forma característica. Gráficos de componentes principales (*Biplots*), donde el eje horizontal es el componente principal 1 y el eje vertical el componente principal 2. Se representan los endofenotipos por latencia (A) y frecuencia (B) de eyaculación con elipses de diferente color en correspondencia con los machos identificados numéricamente que pertenecen a cada endofenotipo. El círculo del centro concentra a los individuos más relacionados. Los vectores en flecha representan los patrones de conducta copulatoria según abreviatura: EL, latencia de eyaculación; EF, frecuencia de eyaculación; ML, latencia de monta; MF, frecuencia de monta; IL, latencia de intromisión; IF, frecuencia de intromisión.

***La conducta copulatoria de la rata macho y la expresión génica relativa de receptores a hormonas sexuales y DNMTs en el sistema límbico son independientes de los endofenotipos por latencia y frecuencia de eyaculación.***

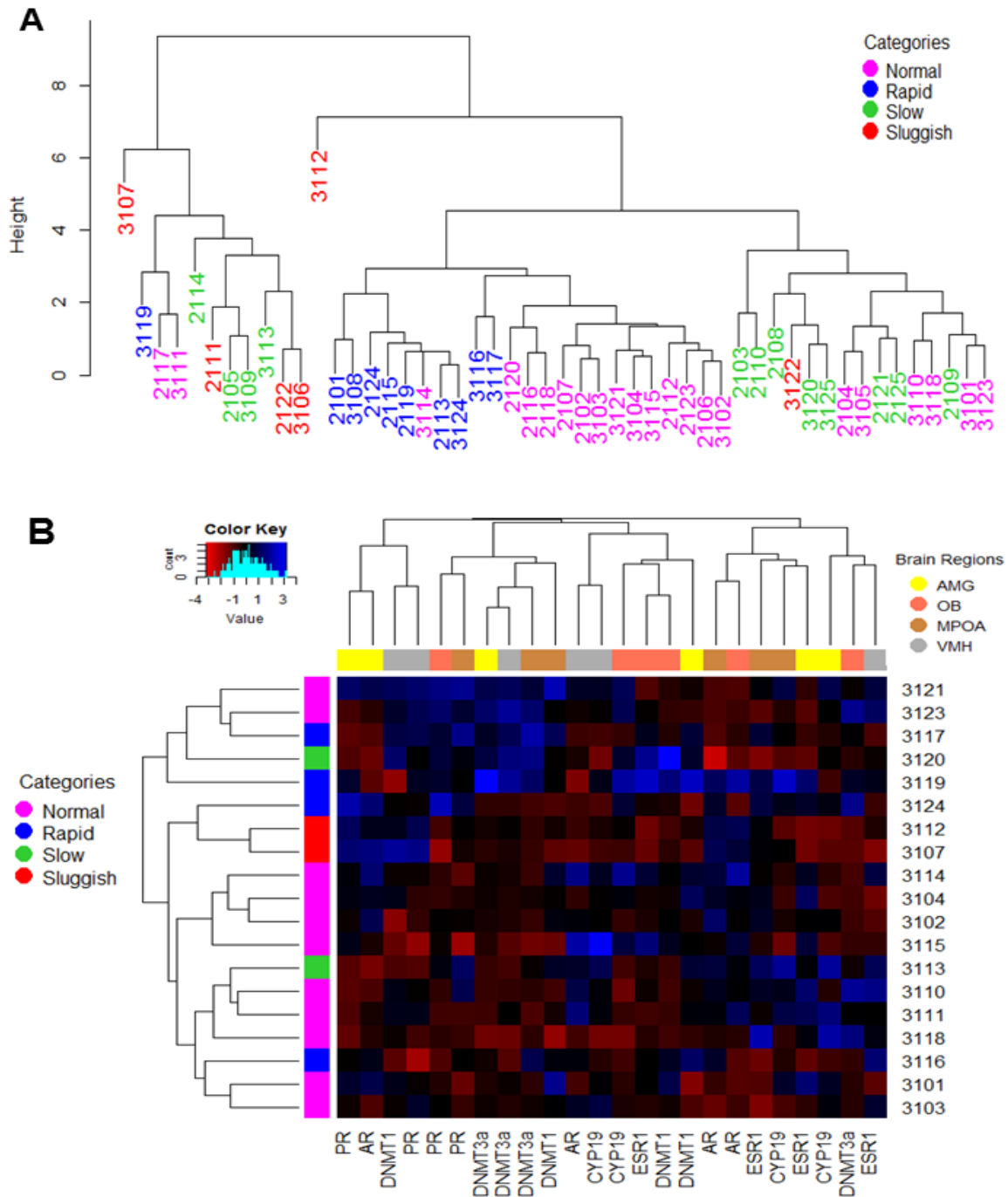
Se ha postulado que los diferentes endofenotipos copulatorios en la rata macho divergen en la expresión de receptores y síntesis de hormonas sexuales, tanto a nivel de la proteína como de la expresión del mensajero en diferentes áreas del sistema límbico. Particularmente, la expresión génica es de relevancia para nuestro estudio, dado que podría ser modulada epigenéticamente por influencia del ambiente, lo cual, otorga cierta plasticidad y podría contribuir a la diversificación de la conducta copulatoria. En consecuencia, nos propusimos 1) validar la consistencia intra-categoría de los endofenotipos por latencia y frecuencia de eyaculación mediante un análisis de aglomeración iterativo de mínima similitud, pues nos permite poner de manifiesto los patrones de semejanza entre los endofenotipos considerando todos los patrones de conducta copulatoria en un dendrograma (Figs. 6A y 7A). 2) Validar la relación entre la expresión relativa de AR, ESR1, PR, CYP19, DNMT1 y DNMT3a y los endofenotipos por latencia y frecuencia de eyaculación, para lo cual, nos valimos de un mapa de calor donde se muestran los datos de expresión relativa de los genes de interés en las áreas del sistema límbico analizadas y añadimos un dendrograma que muestra la relación entre los individuos mediante un algoritmo iterativo de mínima similitud (Figs. 6B y 7B).

En el dendrograma que corresponde a la agrupación de acuerdo a los patrones de conducta copulatoria, observamos que todos los grupos generados bajo el algoritmo de clasificación no-supervisada son heterogéneos respecto a las clasificaciones por latencia o frecuencia de eyaculación que habíamos planteado. Analizando la clasificación a una altura de similitud de 4 (distancia euclidiana), obtuvimos 6 *clusters*, de izquierda a derecha, el primero corresponde al macho *sluggish* 3107, que se muestra como un dato atípico en términos conductuales, así como su semejante, el *sluggish* 3112 que engloba por sí solo el 4to *cluster*. Para el resto de los *clusters*, contrastamos en cada uno, el porcentaje de individuos que pertenecen a alguna de las categorías previamente asignadas por EL, EN para estimar la consistencia entre los endofenotipos y la clasificación no-supervisada. Únicamente el *cluster* 5, de izquierda a derecha, tuvo una consistencia del 90% (9 de 10 individuos) con la categoría de machos *Rapid*, sin embargo, el mismo *cluster* comparte un 64% (14 de 22 individuos) con los machos *Normal*.

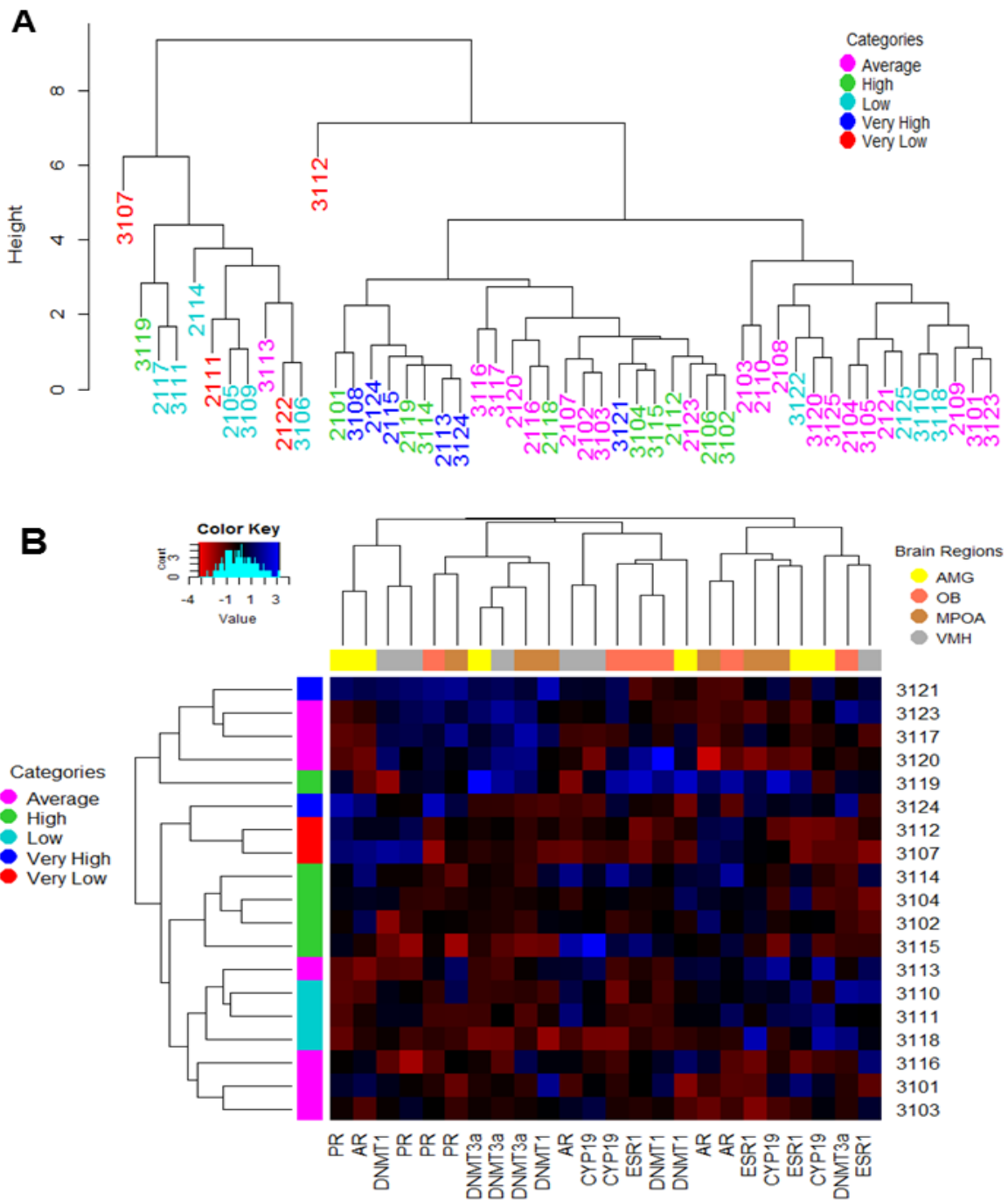
Nuevamente se pone de manifiesto la heterogeneidad de la conducta copulatoria, ya que no guarda ningún patrón categórico que defina un límite o separación.

Respecto a la relación que guardan los diferentes endofenotipos con la expresión relativa de los genes de interés, encontramos un patrón similar al de la agrupación con los patrones de conducta copulatoria, las asociaciones que guardan los machos copuladores de diferentes endofenotipos son heterogéneas e independientes de la categorización asignada ya sea por latencia o frecuencia de eyaculación (Figs. 6B y 7B). Dentro de nuestra muestra de machos copuladores, únicamente los animales *sluggish*/VL mantienen una relación entre conducta y expresión de genes, por lo que únicamente estos animales podrían ser considerados un endofenotipo consistente entre la conducta copulatoria y el patrón de expresión de los genes evaluados en este estudio. No obstante, requerimos una muestra de animales de dicha categoría más amplia para poder validarlo como endofenotipo.

Dado que la conducta copulatoria es un fenómeno que se lleva a cabo a múltiples niveles e involucra un conjunto de estructuras del sistema límbico, es necesario estudiarlas en conjunto, por esta razón, realizamos un último análisis de expresión génica sobre el mismo mapa de calor con los datos completos de expresión génica relativa en todas las áreas de interés; para ello añadimos un dendrograma con el mismo algoritmo de agrupación por mínima similitud entre las áreas del sistema límbico analizadas (Figs. 6B y 7B). Encontramos relacionados al BO y a MPOA respecto a PR y AR, ya que en ambas áreas los dos receptores se agrupan, siendo que por un lado, BO integra las señales olfativas del epitelio nasal y del órgano vomeronasal, y se conoce la importancia de AR en estas funciones. Por otro lado, en MPOA, la testosterona, a través de AR, tiene un papel fundamental para llevar a cabo la conducta sexual; mientras que PR podría reforzar los efectos de AR en estas dos áreas integradoras<sup>68,92</sup>. Otras asociaciones fueron las que se encontraron entre diferentes genes en una misma área límbica, por ejemplo, en AMG, AR y PR; en VMH, AR y CYP19; en MPOA, ESR1 con DNMT1 y ambos con CYP19, lo cual podría indicarnos la forma en que se regulan, de manera individual, cada una de estas áreas para mantener la conducta copulatoria en la rata macho. Debido a esto, decidimos analizar la expresión génica relativa en cada una de las áreas de interés por separado.



**FIGURA. 6. La conducta copulatoria y la expresión de genes son independientes de los endofenotipos por latencia de eyaculación.** Dendrograma que conjunta todos los patrones de conducta copulatoria (A) mostrando la relación de los machos categorizados por latencia de eyaculación, en recuadros rojos se muestran los *clusters* obtenidos a un altura de 4. Mapa de calor con los valores de expresión relativa de AR, ESR1, PR, CYP19, DNMT1 y DNMT3a (B) donde los valores más altos están en azul y los más bajos en rojo según código de color. El dendrograma lateral muestra las asociaciones entre los machos de diferentes categorías; el superior asocia la expresión de genes en las áreas analizadas según el código de color. Cada macho es identificado individualmente con un número de 4 dígitos y categóricamente de acuerdo al código de color insertado. Ambos dendrogramas se llevaron a cabo por el método de asociación por mínima similitud.



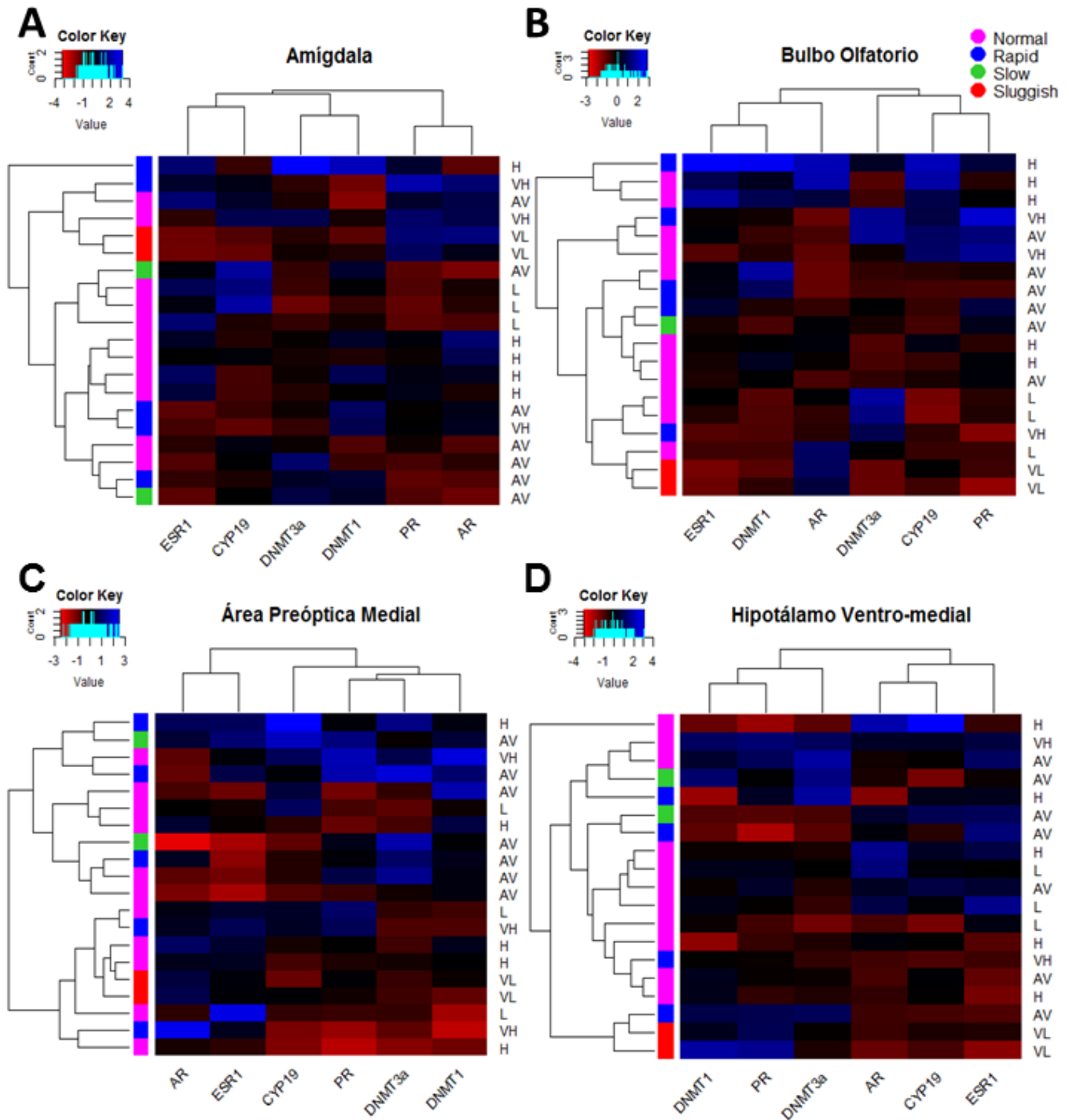
**FIGURA. 7. La conducta copulatoria y la expresión de genes son independientes de los endofenotipos por frecuencia de eyaculación.** Dendrograma que conjunta todos los patrones de conducta copulatoria (A) mostrando la relación de los machos categorizados por latencia de eyaculación, en recuadros rojos se muestran los *clusters* obtenidos a un altura de 4. Mapa de calor con los valores de expresión relativa de AR, ESR1, PR, CYP19, DNMT1 y DNMT3a (B) donde los valores más altos están en azul y los más bajos en rojo según código de color. El dendrograma izquierdo muestra las asociaciones entre los machos de diferentes categorías, el superior asocia la expresión de genes en las áreas analizadas, según el código de color. Cada macho es identificado individualmente con un número de 4 dígitos y categóricamente de acuerdo al código de color insertado. Ambos dendrogramas se llevaron a cabo por el método de asociación por mínima similitud.

***Existen patrones de expresión génica en el sistema límbico de la rata macho que podrían relacionarse con la función área-específica de la conducta copulatoria.***

Nuestros resultados demostraron heterogeneidad en los niveles de expresión génica de receptor a estrógenos alfa (ESR1), receptor a andrógenos (AR), aromatasa (CYP19), receptor a progesterona (PR), DNA-metil-transferasa 1 (DNMT1) y DNA-metil-transferasa 3a (DNMT3a), tal que no hay una relación fehaciente entre la latencia o frecuencia de eyaculación y los niveles expresión relativa en ninguna área del sistema límbico estudiada. Adicionalmente, la información presentada, nos permitió observar una semejanza entre los patrones de asociación de expresión génica relativa entre OB y MPOA y ésta, a su vez, con AMG y VMH. OB y AMG destacan en la fase de cortejo o motivacional y MPOA, VMH, en la fase de consumación de la conducta copulatoria, por consiguiente, nos preguntamos si había algún patrón característico de expresión génica que fuese representativo de la función que cumple cada área en la ejecución de la conducta copulatoria. Para ello, analizamos los patrones de expresión génica de manera individual en AMG, BO, MPOA y VMH mediante el algoritmo de agrupación por mínima similitud para asociar los niveles de expresión génica en la muestra de los individuos identificados de acuerdo al endofenotipo asignado según EL, EN y representamos los datos mediante mapas de calor con sus respectivos dendrogramas.

En amígdala, encontramos una asociación independiente al resto de los genes de interés entre el receptor a andrógenos (AR) y receptor a progesterona (PR) (Fig. 4A), previamente se reportó que durante el desarrollo, PR podría tener un papel inhibitorio sobre la conducta copulatoria al disminuir la expresión de AR en diversas áreas del cerebro, entre ellas la amígdala<sup>68</sup>, donde podrían ambos receptores regular los aspectos motivacionales de la conducta sexual. En bulbo olfatorio, también encontramos dos asociaciones simétricas, de izquierda a derecha, la primera está conformada por DNMT1-ESR1 y AR y la segunda, por CYP19-PR y DNMT3a, al respecto, se ha demostrado que la supervivencia celular en BO es dependiente de los estímulos olfativos<sup>93</sup> y para los de importancia copulatoria, se requiere que la testosterona facilite la señal a través de AR<sup>94</sup>; mientras que las DNMTs están implicadas en los procesos de diferenciación celular<sup>95</sup> como los que ocurren durante la neurogénesis en el bulbo olfatorio (Fig. 4B).

En MPOA y VMH encontramos un patrón de expresión relativa similar entre los genes que codifican para PR, DNMT1 y DNMT3a. En MPOA, AR y ESR1 se expresan de manera similar (Fig. 4C), ya que MPOA es un área esencial en el control de la conducta sexual en todos los vertebrados y es altamente sensible a testosterona y a su metabolito estradiol para sincronizar los aspectos tanto motivacionales como de consumación de la conducta sexual<sup>23</sup>. Mientras que en VMH se observaron dos grupos de asociación simétricos, el que tiene en común con MPOA, entre la expresión génica relativa de las DNMTs y PR y el segundo, una asociación de similitud en cuanto a AR-CYP19 y ESR1 (Fig. 4D); nuevamente, éstos últimos son los tres efectores clásicos de mayor importancia en la coordinación de los movimientos motores y eyaculación en la rata macho<sup>27</sup>. Para corroborar el sentido y la magnitud de las asociaciones observadas en los mapas de calor, realizamos gráficos de correlación con los datos de expresión génica relativa para cada una de las áreas analizadas que se presentan en la sección de anexos como figura suplementaria 8 del anexo 4. Utilizando un intervalo de confianza del 95% y nivel de significancia igual o menor a 0.01, el coeficiente de correlación de 0.72 entre AR y PR en AMG no es estadísticamente significativo. Por el contrario, sí los son las correlaciones entre ESR1 y DNMT1 (coeficiente de corr. 0.77) en BO, la de AR y DNMT3a (coef. -0.51) en MPOA y la que corresponde a PR y AR (coef. -0.38) en VMH. Si estas correlaciones con significancia matemática tienen o no relevancia biológica, es algo que se discutirá en la sección correspondiente.



**FIGURA 8.** Asociaciones que muestran la similitud de la expresión génica relativa de AR, ESR1, PR, CYP19, DNMT1 y DNMT3a en las áreas límbicas de interés. Mapa de calor con los valores de expresión relativa donde los valores más altos están en azul y los más bajos en rojo según código de color. El dendrograma lateral muestra las asociaciones entre los machos clasificados por latencia de eyacuación, según el código de color de la barra lateral izquierda y por frecuencia de eyacuación, de acuerdo a las abreviaturas indicadas a la derecha. El dendrograma superior asocia la expresión de genes en cada una de las áreas analizadas. Ambos dendrogramas se llevaron a cabo por el método de asociación por mínima similitud. VL, Very Low; L, Low; AV, Average; H, High; VH, Very High.



# DISCUSIÓN

---

Hasta hoy, la conducta sexual y sus diferentes manifestaciones han sido concebidas mediante dos planteamientos contrapuestos, el primero establece que las diferencias inter- e intra-sexuales son agrupadas categóricamente a la vez que se relacionan con un patrón morfo-fisiológico característico de cada categoría predeterminada<sup>1,3,4,7,41,96,97</sup>. El segundo planteamiento, considera que no existen límites claros entre las diferentes manifestaciones de la conducta sexual, sino que son graduales e individualmente particulares<sup>11-13,16,85-88</sup>. Cada una de las propuestas tiene evidencia que las apoya y si bien, ambas admiten cierta fluidez sexual ya sea a través de diferentes categorías o de forma continua, tienen diferentes implicaciones sobre el conocimiento y percepción de la conducta sexual. Los resultados que publicamos apoyan la propuesta de que la conducta copulatoria de la rata macho se presenta de forma continua en la población y que es característica individualmente; probamos que los endofenotipos típicamente utilizados para clasificar a un grupo de individuos conductual y biológicamente no mantienen la consistencia suficiente al considerar otros patrones de conducta copulatoria ni al determinar los niveles de expresión génica relativa por individuo en cada categoría.

Los endofenotipos copulatorios basados en la latencia o frecuencia de eyaculación como criterio de clasificación se disgregan al analizarlos bajo el contexto de cualquier otro parámetro de conducta copulatoria. Es un supuesto que al introducir nuevas variables relacionadas, los endofenotipos deberían incrementar la consistencia y demostrar una mayor diferencia entre ellos<sup>53,98-101</sup>, no obstante, nuestros resultados demuestran lo contrario, al incluir cualquier otro patrón al análisis, ya no hay una distinción entre endofenotipos. Si bien las gráficas que corresponden al patrón utilizado como criterio de jerarquización, latencia o frecuencia de eyaculación, se aprecian como grupos diferentes, cuando se incluye alguno de los otros patrones de conducta como co-variable, la inconsistencia de los endofenotipos asignados es evidente, como se observa en las gráficas de cajas y bigotes, donde se muestran los datos individuales para los diferentes patrones de conducta copulatoria e independientemente del endofenotipo correspondiente, todos los individuos de la muestra comparten datos. Las curvas de densidad de probabilidad reiteran este comportamiento observándose un traslape entre las curvas de los diferentes endofenotipos. Adicionalmente, las gráficas de cajas y bigotes

muestran individuos con valores atípicos y algunas curvas de densidad de probabilidad son multimodales, lo cual exhibe la diversidad de la conducta copulatoria a nivel intra-categorico.

Con el fin de evidenciar y examinar la diversidad de la conducta copulatoria, utilizamos un análisis exploratorio multivariado, en el cual incluimos todos los parámetros de conducta copulatoria evaluados y graficamos en un biplot de PCA, esto nos permitió observar la relación entre los parámetros conductuales junto con la contribución de cada individuo a la variabilidad de los mismos. Observamos que los datos individuales de los machos estudiados se dispersan sobre la recta formada por los vectores correspondientes al número de eyaculaciones y la latencia de eyaculación (EN, EL, respectivamente), donde cada vector es representado con una flecha que indica el sentido en que crecen los valores para los parámetros de conducta copulatoria. En el extremo que indica un mayor número de eyaculaciones se conjuntan todos los machos *rapid/VH*, mientras que en el extremo opuesto, donde se representan los valores más altos de latencia de eyaculación, se encuentran dispersos los animales *sluggish/VL*. En la región entre estos dos grupos extremos, se colocan los endofenotipos intermedios, donde los sujetos que corresponden a ellos, gradualmente se van acercando a uno u otro extremo. Los individuos que se sitúan cerca del origen de los vectores correspondientes a los parámetros de conducta copulatoria, tienen una contribución mínima en la varianza de la muestra, dichos animales pertenecen a *normal/AV* principalmente, es decir, pareciera que a partir de un fenotipo con una mínima variabilidad conductual, se lleva a cabo una divergencia en la manifestación de la conducta copulatoria de otros individuos que se dispersa hasta tocar extremos opuestos, tal como sería descrito para la orientación sexual humana por Alfred Kinsey hace más de 50 años<sup>10</sup>.

El análisis por componentes principales pone de manifiesto dos resultados, el primero es que refrenda la inconsistencia de los endofenotipos copulatorios, pues no hay un límite claro entre uno y otro, por el contrario, los únicos endofenotipos completamente separados son *rapid/VH* y *sluggish/VL*, como se observaría en un fenómeno continuo. Por otro lado, evidencia la individualidad de la conducta copulatoria de la rata macho, ya que independientemente del endofenotipo asignado, los machos que se alejan del origen son representados de manera particular por alguno de los patrones conductuales evaluados. Adicionalmente a que los machos

de las diferentes endofenotipos se colocan sobre un eje que corresponde a EN, EL, también se sitúan perpendicularmente sobre los vectores que representan IL, ML, MN, IN, en dirección a donde aumentan los valores para estos patrones conductuales, lo cual implica que dichos individuos se caracterizan por una mayor latencia de monta (macho 3108), latencia de intromisión (macho 2110), o un mayor número de montas e intromisiones (machos 3113, 2122) independientemente del endofenotipo al que pertenecen. Por lo tanto, cada macho tiene un comportamiento copulatorio particular que no guarda relación con el endofenotipo asignado por EL o EN, sino que está determinado por cualquier otro parámetro de conducta copulatoria.

Un tercer aspecto que nos permitió demostrar el PCA fue la relación entre los parámetros de conducta copulatoria evaluados, ya que la forma como se agrupan los vectores que los representan en el biplot, nos permite visualizar qué tan relacionados se encuentran; entre menor sea el ángulo formado entre dos vectores, mayor será la relación entre las variables que representan. De igual modo, dos vectores que se encuentren en direcciones opuestas, implicarán una correlación negativa entre sus variables. Finalmente, los vectores que formen entre sí un ángulo mayor de  $90^\circ$ , referirán a variables que no se correlacionan. Podemos observar la correlación negativa entre el número de eyaculaciones y la latencia de eyaculación, así como la correlación estrecha entre las latencias de mota e intromisión y la independencia que tienen con el número de motas y de intromisiones. Asimismo, las variables más relacionadas con la latencia de eyaculación son el número de montas y de intromisiones; de hecho, los animales que se colocan cercanos a una mayor latencia de eyaculación, también presentan un mayor número de montas e intromisiones, lo cual podría indicar que estos animales requieren de una mayor estimulación somato-sensorial en los genitales para alcanzar la eyaculación, como se ha propuesto previamente<sup>102-104</sup>. Esta representación visual de los datos fue corroborada mediante los gráficos de correlación (*CorrPlots*) que se muestran en la figura suplementaria 6 donde se indica el coeficiente de correlación de todas las variables analizadas y únicamente la correlación negativa entre EN y EL es estadísticamente significativa con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ . Otra correlación que presenta significancia estadística pero no biológica, es la que existe entre MN y IN, ya que cada intromisión registrada corresponde también a una monta en las pruebas copulatorias.

Con los análisis anteriores pusimos de manifiesto la indistinción de los endofenotipos establecidos por EN, EL, dado que los machos que forman parte de ellos se muestran similares en otros parámetros conductuales; para evaluar la posibilidad de que estas semejanzas conductuales pudieran dar lugar a agrupaciones endofenotípicas distintas a las que se han establecido clásicamente por latencia o frecuencia de eyaculación, sometimos los datos conductuales a un análisis de agrupación no supervisada por el algoritmo de mínima similitud. Dado que el análisis por PCA ya había mostrado que la divergencia de conducta copulatoria ocurre desde un grupo de animales que tienen una conducta parecida y debido al traslape entre los endofenotipos observada en las curvas de densidad de probabilidad, este algoritmo nos permite agruparlos aumentando la distancia de similitud entre los *clusters*, lo que resulta en agrupaciones delimitadas que pueden ser comparadas y contrastadas con los endofenotipos típicamente utilizados. El dendrograma obtenido agrupó animales de todos los endofenotipos sin ningún patrón endofenotípico evidente y exhibió dos animales (3107, 3112) *sluggish*/VL que presentan patrones de conducta copulatoria atípica y por lo tanto, se agrupan de manera independiente al resto de la muestra y no pueden formar parte de ningún *cluster*. Debido a esto, elegimos un punto de corte a la altura de 4 en distancia euclidiana para contrastar los grupos obtenidos con los endofenotipos por EL, EN, ya que a esta altura, dejamos fuera de las agrupaciones a estos dos animales y examinamos los 4 grupos resultantes de animales con conducta copulatoria semejante, pero no guardan consistencia con ninguno de los endofenotipos predeterminados. El grupo con mayor consistencia fue el *cluster* 5 de izquierda a derecha con el 90% de animales *Rapid* utilizando EN como criterio de clasificación, sin embargo, comparte características copulatorias con el 64% de los animales del endofenotipo *Normal*. Por lo tanto, los machos de la muestra persisten en mantener patrones de semejanza independientes a sus valores característicos de EN y/o EL sin una segregación distintiva grupal, sino de semejanzas particulares entre los individuos.

Un precepto que se refiere a los endofenotipos, es la relación que tienen entre la expresión fenotípica y un conjunto de factores génicos, bioquímicos o morfológicos que puedan predecir y determinar un endofenotipo<sup>53,98-101</sup>. Los endofenotipos copulatorios de la rata macho han reportado diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los niveles de expresión génica, número de células que expresan la proteína e identificación de receptores con

anticuerpos marcados implicados en el metabolismo y señalización de hormonas sexuales<sup>38,43,44</sup>. Así, nos propusimos buscar alguna relación entre los endofenotipos predeterminados por latencia o frecuencia de eyaculación y los niveles de expresión de AR, ESR1, PR, aromatasa y DNA-metil-transferasas 1 y 3a mediante el análisis de agrupación no supervisada utilizado previamente para los patrones de conducta copulatoria. La única asociación encontrada fue entre los dos animales *sluggish*/VL, podríamos pensar que se trata del único endofenotipo real, no obstante, en el dendrograma de asociación obtenido a partir de los patrones conductuales, no hay una asociación entre éstos, sino que ambos se presentan como individuos atípicos que guardan una mínima relación con el resto de la muestra y entre ellos. Esto pone de manifiesto la disociación que existe entre los endofenotipos, la expresión relativa de los genes de interés y el conjunto de los patrones de conducta copulatoria entre los machos analizados.

Aledaño al objetivo principal de probar la consistencia de los endofenotipos eyaculatorios de la rata macho, este estudio nos permitió ahondar en la fisiología de la conducta copulatoria en una muestra de machos copuladores, teniendo en cuenta que los estudios previos incluyen grupos de animales que muestran de antemano una conducta copulatoria diferente. Aprovechamos el mapa de calor donde representamos los niveles de expresión génica relativa en AMG, OB, VMH y MPOA para asignar un segundo dendrograma que muestre la asociación entre las áreas analizadas y encontramos algunas que podrían dar razón de la comunicación y función de las regiones del sistema límbico con el despliegue de la conducta copulatoria. Observamos que OB y MPOA se agrupan para AR y PR, lo que indica que los niveles de expresión génica relativa de ambos genes son similares en estas dos áreas en la muestra de animales analizados. MPOA y OB son distantes anatómicamente, sin embargo, ambos tienen funciones integradoras necesarias para el despliegue de la conducta copulatoria, mientras que OB recibe la información sensorial contexto-dependiente que inicia la conducta sexual<sup>19,24,27</sup>, MPOA es el área fundamental para recibir la señal aferente, integrarla y enviarla a los núcleos espinales que dan lugar a los patrones motores y que culminan con la eyaculación<sup>19,25,47,105</sup>. Por lo tanto, los efectos de las hormonas sexuales sobre estas áreas tendrían que ser particularmente sensibles y regulados. Se sabe que la función de la testosterona a través de AR tiene una relación estrecha con la progesterona y PR, ya que se requiere de ambas para mantener la conducta

copulatoria<sup>68,92,106</sup>. Se ha reportado que más de la mitad de los animales castrados tratados con dosis fisiológicas de progesterona y más del 70% de los animales que reciben solo testosterona pueden restablecer las montas e intromisiones. Mientras que el 100% de los animales que reciben dosis fisiológicas de testosterona y progesterona, son capaces de volver a desplegar completamente la conducta copulatoria<sup>92</sup>. Además, se observó que la administración neonatal del antagonista de PR, RU486, aumenta la conducta copulatoria en las ratas macho adultos acompañado de un mayor número de células inmuno-reactivas a AR en MPOA, VMH y AMG<sup>68</sup>. Así, a través de PR, la progesterona tiene un papel en la función de las estructuras límbicas que modulan la conducta copulatoria de la rata macho desde etapas tempranas del desarrollo en conjunto con la testosterona y AR.

Un segundo *cluster* que llamó nuestra atención es el correspondiente a las expresiones relativas de DNMTs en AMG, VMH y MPOA, pero no para OB, que a diferencia de las primeras, presenta neurogénesis activa y recambio celular constante<sup>93,107,108</sup>. Las DNMTs son enzimas que catalizan la metilación de las citosinas, con lo cual, facilitan la incorporación de varias proteínas que impiden la accesibilidad de los factores de transcripción a diferentes regiones del ADN, por lo que se les ha implicado en los procesos de diferenciación y maduración celular<sup>95,109,110</sup>. A nivel del sistema nervioso central, se ha reportado que las DNMTs son requeridas en la plasticidad sináptica y para consolidar los procesos de memoria y aprendizaje<sup>111-113</sup>. Por otro lado, se demostró que los estímulos olfativos y la actividad sexual incrementan la supervivencia y el número de células nuevas que arriban al bulbo olfatorio de la rata macho. Dado que estas células se encuentran en proceso de diferenciación durante la migración desde la zona sub-ventricular y el caudal rostral, la participación y función de las DNMTs podría ser particularmente activa. Paredes y colaboradores<sup>93,107</sup> demostraron que la actividad sexual favorece la proliferación celular en la capa interna del bulbo olfatorio accesorio de las ratas macho que eyacularon al menos 3 veces cuando controlan la interacción sexual. Debido a que la muestra de ratas macho que analizamos es de ratas macho copuladoras que presentaron al menos 3 eyaculaciones, la necesidad de estas enzimas podría ser mayor que en otras regiones límbicas, donde, aunque también participan la consolidación del proceso de aprendizaje de la conducta copulatoria, no se llevan a cabo procesos constantes de proliferación y supervivencia celular.

La información obtenida en el mapa de calor con los niveles de expresión relativos de todas las áreas límbicas incluidas en el análisis nos planteó la posibilidad de estudiar los patrones de expresión génica relativa en cada área por separado. No obstante, estos resultados no los publicamos debido a que nos pareció que con la información obtenida previamente asentábamos el mensaje y resultado principal de la investigación. Observamos que OB presenta un dendrograma de asociación particular, que muestra dos *clusters* en espejo, donde AR y DNMT3a tiene una rama independiente cada uno. Durante los procesos de proliferación y diferenciación celular en OB, la participación de AR para facilitar las acciones de la testosterona en la conducta copulatoria es fundamental, por lo que estas células nuevas requerirían de la expresión constante de AR, independientemente de otros procesos de diferenciación donde participa DNMT3a, que en conjunto, podrían mantener la funcionalidad para responder a las señales olfativas sexuales. En AMG encontramos 3 *clusters*, uno que agrupa los niveles de expresión de AR y PR, otro para ESR1-CYP19 y el que corresponde a las DNMTs. AMG es una estructura de relevo importante en la conducta sexual, ya que envía proyecciones hacia BNST y MPOA, debido a eso, podría ejercer una modulación en la intensidad de la señal olfativa recibida para llevar a cabo de manera coordinada las fases apetitiva y consumatoria a través de un balance de los efectos de las hormonas sexuales, por ello los niveles de expresión de AR y PR son similares a la par de ESR1-CYP19.

Finalmente, VMH y MPOA, mantienen patrones de asociación muy parecidos, pues en ambos se agrupan los niveles de expresión relativa de DNMTs y PR juntos y en otro, los de AR, ESR1 y CYP19. Esto podría deberse a la contigüidad anatómica de VMH y MPOA, sin embargo, no puede descartarse la similitud funcional. Se sabe que el área central en el despliegue de la conducta sexual es MPOA, la cual, manda aferencias hacia VMH, un área de relevo que proyecta a los núcleos espinales que mantienen los patrones motores necesarios para alcanzar la eyaculación<sup>19,24</sup>. Si bien cada área tiene patrones de similitud particulares, la asociación entre AR-ESR1, CYP19 podría indicar una regulación hormonal precisa de estas dos áreas. Considerando que mientras que MPOA es el área de regulación sexual masculina por excelencia, su contraparte, VMH, lo es para la femenina y que existen reportes que fuera del periodo crítico de diferenciación sexual puede ocurrir una reversión de la conducta sexual por efecto de agentes metilantes<sup>62,69</sup>, podría ser que según plantea el modelo de la vía común<sup>16</sup>, la

plasticidad de estas áreas límbicas permita la expresión de diferentes manifestaciones de la conducta sexual en respuesta a las señales ambientales feminizantes, desfeminizantes o masculinizantes.

Al comparar estas asociaciones gráficas mediante el dendrograma de similitud con los *corrplots* presentados en las figuras suplementarias 9 y 10 que contienen los coeficientes de correlación y se muestran los que son estadísticamente significativos ( $p \leq 0.01$ ), podemos constatar algunas asociaciones pero otras no, algunas de ellas podrían tener significancia biológica y otras, probablemente no. Por ejemplo, la asociación entre los niveles de expresión de ESR1 y DNMT1 podría deberse a una asociación metodológica. En cuanto a MPOA y VMH, que no presentaron esta situación, la correlación entre AR-DMT3a y AR-PR, respectivamente, no se representa en el dendrograma de similitud ¿Qué análisis es más certero para representar la relación entre dos variables? Como ya se mencionó, el dendrograma es obtenido a partir de un algoritmo de mínima similitud, asociando, iterativamente, un nuevo elemento al elemento más disímil en un *cluster*, a partir del cálculo de distancia euclidiana<sup>114</sup>. Mientras que los *corrplots* aquí presentados, utilizan el coeficiente de correlación de Pearson para establecer una relación lineal entre dos variables, por lo que dependerá de que las variables estudiadas mantengan una relación lineal y es sensible a valores extremos<sup>115,116</sup>. Por lo tanto, si bien los gráficos de correlación muestran las asociaciones lineales de los valores de expresión génica relativa, esto no implica que tengan una asociación biológica.

Una cuestión a discutir en esta investigación es el origen de la divergencia conductual observada en una muestra endogámica de ratas macho que proviene de progenitores tipificados como copuladores eficientes, por lo que esperamos que caigan en un endofenotipo *AV-Rapid*, de acuerdo al criterio de clasificación aquí utilizado. En contraste, la diversidad conductual observada incluye al 34% de animales *Slow* y *VL* ¿cómo es que emergen estos supuestos endofenotipos? De todos los posibles factores que se describieron en el capítulo 3 del marco teórico, el que tiene mayor sustento es el factor epigenético, ya que existe evidencia que apoya que durante el desarrollo e incluso fuera de los periodos críticos, una variedad de factores establecen diferentes marcas epigenéticas con efectos duraderos que se traducen en la conducta sexual desplegada en la etapa adulta. La posición intra-uterina<sup>67</sup>, la exposición prenatal al



estrés<sup>117</sup>, a los disruptores endócrinos<sup>57</sup>, entre otros que se mencionaron previamente han demostrado modificar las conductas sociales en diferentes modelos animales y que podrían estar ocurriendo incluso en poblaciones endogámicas. Además, la herencia epigenética podría tener mayor relevancia que la herencia genética en estos procesos, pues puede aparecer de una generación a otra sin necesidad de que ocurra a lo largo de muchas generaciones<sup>110</sup>. Incluso, muchas marcas epigenéticas podrían ser establecidas como respuesta a la presión ambiental, permitiendo la adaptabilidad y plasticidad conductual más adecuado al contexto. Dos aspectos que quedan fuera del alcance de este estudio se refieren a la posibilidad de heredar algún o algunos aspectos de la conducta sexual y establecer un reto particular que haya demostrado tener efectos en la conducta sexual mediante la regulación epigenética para re-evaluar y contrastar el fenómeno de conducta copulatoria en otra muestra de animales, así como determinar si existen diferencias entre las marcas epigenéticas en las dos muestras analizadas.

Adicionalmente, reconocemos las limitaciones de este estudio y discutimos las objeciones que puede generar. El tamaño de la muestra puede ser adecuado e incluso sobre-estimado si se tratara de una población homogénea en cuanto a la conducta copulatoria de los machos estudiados, sin embargo, encontramos diferente número de machos que pueden ser tipificados en al menos 4 endofenotipos eyaculatorios, en algunos, encontramos solo 2 individuos en cada muestra de 25 animales, como ocurrió con los *sluggish*/VL. Por lo tanto, para poder enriquecer y mantener un número comparable de animales de los diferentes endofenotipos, tendríamos que muestrear al menos, 3 grupos de 25 animales. Esta limitación sale de nuestro control, ya que una vez que los animales salen de la unidad de modelos animales de la institución, no pueden ser devueltos y los animales en exceso tendrían que ser sacrificados, cuestión que sale de los lineamientos éticos para los estudios con modelos animales. Otra limitación es el grupo de genes elegidos para analizar los endofenotipos eyaculatorios, ya que en este estudio incluimos arbitrariamente los genes que han sido reportados en estudios previos con diferencias estadísticamente significativas entre animales copuladores, no copuladores y *sluggish*. Asimismo, dichos genes son clásicamente estudiados en la diferenciación sexual del cerebro, pues regulan a nivel local la biodisponibilidad de hormonas sexuales<sup>27,35,118</sup>. No obstante, estamos conscientes de que existen otros genes, moléculas y sustancias químicas que podrían funcionar de manera más consistente como marcadores endofenotípicos, por ejemplo, ciertos

neurotransmisores y sus receptores, mutaciones génicas particulares, número de células, innervación y comunicación celular, etc<sup>25,31,119-121</sup>. Finalmente, comentar que este estudio se dirigió a algunas estructuras límbicas, sin embargo, hay bastante información que apunta a regiones espinales, pélvicas e incluso genitales que no se contemplaron en este estudio, pero que considero, ameritan un estudio enfocado en ellas, evaluando los parámetros fisiológicos pertinentes y específicos, más allá de los que aquí se reportan<sup>18,26,29,42,103,122</sup>.

Al comparar y contrastar este estudio con otros reportes, nos percatamos de que hasta ahora, no se había realizado un análisis multivariante de la conducta copulatoria de la rata macho, ya que los estudios partían de asumir que todos los machos copuladores tenían una conducta homogénea. Incluso los machos categorizados en este estudio como *sluggish*/VL no son considerados como *sluggish* en la categorización clásica de endofenotipos eyaculatorios, ya que en nuestra muestra, estos animales eyacularon al menos 1 vez en una prueba de 30 minutos, mientras que típicamente, el endofenotipo *sluggish* presenta una latencia de eyaculación mayor a este lapso. Debido a esto, las comparaciones neurobiológicas reportadas parten de grupos de animales con diferencias conductuales pre-existentes, que a su vez, han correlacionado con diferencias estadísticamente significativas entre grupos. Otro aspecto a considerar, es que los estudios previos tienen un grupo de referencia que presenta una conducta copulatoria “óptima”, seleccionando a los machos que mantienen cierta latencia de eyaculación o número de eyaculaciones y que utilizan para comparar otros grupos de animales con conducta copulatoria “no-óptima”<sup>92</sup>. Adicionalmente, se han reportado variaciones en el número de pruebas que tardan los machos en alcanzar una conducta copulatoria “óptima”, que va de 4 hasta 12 pruebas semanales<sup>6</sup>. Lo que observamos de estos estudios, es que independientemente del número de pruebas copulatorias realizadas, después de la 4ta prueba, la conducta copulatoria ya no se modifica a través del tiempo, lo que en otros reportes han asumido como una insuficiencia de pruebas conductuales para que la conducta copulatoria sea aprendida de manera “óptima”<sup>92</sup>. Estas asunciones deben ser tomadas con precaución, ya que el modelo de la rata macho ha sido, por excelencia, el modelo animal para el desarrollo de fármacos en estudios preclínicos para disfunciones eyaculatorias en humanos<sup>3,6,37</sup>. En comparación con otros reportes, el nuestro aporta un análisis exploratorio de la conducta copulatoria de la rata macho que no se había realizado y que aporta una perspectiva más amplia del fenómeno que exhibe la

diversidad de la conducta copulatoria de la rata macho que había sido asumida como homogénea.

En lo que respecta a las objeciones hacia este estudio, me gustaría discutir las que fueron recibidas durante el proceso de selección y revisión del artículo ahora publicado y que se resumieron en 3 puntos, la influencia de la testosterona sobre la conducta copulatoria de la rata macho, el uso de otros análisis estadísticos para probar la correlación de endofenotipos y la relevancia o incomprensión del problema científico planteado. Primero, es ampliamente conocida la influencia de la testosterona sobre la conducta sexual, existen muchos estudios realizados en animales castrados y posteriormente administrados con diferentes hormonas<sup>123-126</sup>, sin embargo, también se sabe que bajo condiciones fisiológicas, los niveles de testosterona mantienen la conducta sexual pero no implica que exista una relación lineal entre ambas, es decir, que a mayores niveles de testosterona no ocurre un aumento en el número de eyaculaciones o una menor latencia de eyaculación<sup>125</sup>. Como se menciona en el marco teórico, los niveles de testosterona son indistintos entre machos copuladores y no copuladores. De hecho, la reconstitución hormonal a nivel de MPOA tiene un efecto muy variado en una muestra de machos copuladores<sup>46</sup>, por lo tanto, los niveles de testosterona en una muestra de machos copuladores es un dato adicional que difícilmente aporta sustento a nuestro planteamiento. Sin mencionar que requiere constante manipulación del animal, sometiéndolo a un proceso de estrés innecesario, que sí podría tener un efecto negativo sobre el despliegue de la conducta copulatoria<sup>117</sup>.

En cuanto al uso de otros análisis estadísticos, se realizó la sugerencia de realizar una regresión logística o correlación canónica entre número de eyaculaciones y la latencia de eyaculación con los endofenotipos. A mi consideración, la elección del elemento matemático en investigación depende totalmente de la pregunta a contestar y de la naturaleza de la muestra a analizar. Con gráficos sencillos como los *boxplot* habíamos demostrado la diversidad de los datos y la inconsistencia de los endofenotipos, por lo tanto ¿era necesario refrendarlo mediante un análisis matemático cuya robustez depende de la homogeneidad y linealidad de los datos? Si bien los análisis matemáticos que pueden devolver una significancia estadística son útiles para puntualizar diferencias con cierta certeza de que no ocurren por mero azar, también exigen que

los datos a analizar cumplan ciertos requisitos, que cuando se trata de comparar efectos de un tratamiento deben ser controlados. No obstante, muchos de los fenómenos en la naturaleza son diversos, por lo que su observación no puede estar ceñida a condiciones finamente controladas. Para el diseño de este experimento, elegimos los análisis matemáticos que nos permitieran observar la diversidad de la conducta copulatoria, probar la inconsistencia de endofenotipos y contrastarlos partiendo de una muestra que presenta una alta variabilidad. Los análisis sugeridos por el revisor son sensibles al tamaño de la muestra y buscan ajustes lineales de variables, que como se discutió antes, puede dar lugar a lo que se conoce como correlaciones espurias cuando la muestra analizada no se ajusta al modelo matemático<sup>116,127</sup>.

En cuanto al tercer punto, fue estimulante saber que existen personas que no cuestionan la diversidad de la conducta sexual. No obstante, la revisión de los reportes científicos se lleva a cabo por investigadores con experiencia y conocimiento en el área, para quienes el problema podría radicar en causalidades, que como mencionamos, es un aspecto que quedó fuera del alcance de este estudio. Esta objeción me llevó a reflexionar sobre las enormes fronteras del conocimiento, ya que para muchos miembros de la comunidad científica, el estudio de la diversidad sexual no representa un problema científico a resolver y sin embargo, fuera del gremio, existen tantas preguntas sin respuesta que la diversidad sexual se ha convertido en un tabú. Es claro que el reporte publicado va dirigido a la comunidad científica, pero para hacer ese conocimiento del alcance de quienes buscan respuestas es indispensable el papel del divulgador científico y del científico docente, profesiones que actualmente son demeritadas por muchos científicos y probablemente, esa sea la principal barrera del conocimiento: la falta de interacción y capacidad de comunicar el conocimiento a quienes no tienen una formación científica. Pareciera, que hoy en día, no se obtiene un grado académico, sino un título nobiliario con el que el Doctor en Ciencias se encierra en su laboratorio a hacer experimentos, en el mejor de los casos. La realidad es que se encierra a empaparse de conocimiento para sí mismo compitiendo por algún fideicomiso que subvencione su investigación, para producir más datos que justifiquen su productividad y si algún conocimiento es generado, es exclusivo para sus símiles sin devolver nada a quienes financian la investigación. Por lo tanto, es urgente cambiar la forma de evaluar la aportación científica, para que pase de ser una actividad productiva a una actividad prolífica que trascienda grupos y fronteras para que esté a disposición de quienes

requieren del conocimiento y a quienes servimos con nuestras investigaciones. Pues si es verdad que el primer vestigio de la civilización humana fue el hallazgo de un fémur que sanó de una fractura ¿no es la compartición del producto de nuestro trabajo lo que ha erigido esta sociedad?

Finalmente, este estudio realizado en la rata macho tiene como objetivo profundizar en el conocimiento de la diversidad sexual, por lo que buscamos extrapolar lo que observamos en el modelo animal para poder realizar deducciones y abrir la posibilidad de formular nuevas preguntas y paradigmas acerca de la sexualidad humana. Esto es válido debido a que los modelos animales nos permiten realizar observaciones sin el sesgo del factor social, que en el caso de los humanos, es trascendental<sup>88</sup>. Esto ha sido un arma de doble filo, ya que por un lado se ha enfatizado la importancia del estudio de la sexualidad por las áreas de las ciencias sociales, pero también ha promovido opiniones públicas que consideran que las diferentes formas de diversidad sexual son consecuencia exclusiva de la sociedad, de sus cambios de normas y estructuras, pero ¿Son cambios causados por el contexto social u ocurren como consecuencia de la adaptación biológica a la combinación de diferentes factores, no solo sociales, sino biológicos, que se experimentan de manera individual y dictan la naturaleza sexual de cada uno? Nuevamente, esta cuestión requiere de una respuesta por parte de las ciencias biológicas y cuando se realiza una búsqueda de la literatura, la información es limitada y en su mayoría recurre a modelos animales, lo cual, sí puede ser atribuido a un fenómeno social, ya que la investigación en humanos requiere mayor tiempo y recursos.

Desafortunadamente, en muchos países, incluyendo México, para la ciencia, el sexo es una línea de investigación de lujo, ya que se consideran prioritarias otras áreas de la salud que buscan terapias para diferentes enfermedades que minan económicamente la productividad del país, pero si consideramos la salud social ¿No ha promovido más daño económico, división y violencia la falta de interés en la investigación sexual? Si pudiéramos realizar un estudio cuantitativo, probablemente, los prejuicios en torno a la diversidad sexual han cobrado tantas vidas en México que la diabetes, el cáncer y la reciente COVID-19. Afortunadamente, muchas enfermedades de importancia económica pueden ser prevenidas e incluso erradicadas mediante una vacuna eficaz, pero para los prejuicios, la única vacuna que existe es el conocimiento y en

eso, las ciencias biológicas, han quedado a deberle a la sociedad mexicana. Así, el presente estudio es valioso en tanto que aporta conocimiento a un área de las ciencias biológicas y de la salud que ha sido menoscabada en detrimento de la perspectiva científica que permita a toda la sociedad una mejor comprensión de la cotidiana diversidad sexual.

## CONCLUSIONES

---

1. Los endofenotipos copulatorios basados en el número de eyaculaciones totales o latencia de eyaculación promedio en la rata macho son inconsistentes en términos de cualquier otro parámetro de conducta copulatoria.
2. Mediante los análisis multivariados por PCA y por agrupación no supervisada de los parámetros de latencia y frecuencia de eyaculación, monta e intromisión, pusimos de manifiesto que la conducta copulatoria de la rata macho se comporta de manera continua e individualizada en una muestra endogámica de machos copuladores.
3. No existe una relación entre los diferentes endofenotipos copulatorios basados en el número de eyaculaciones totales o latencia de eyaculación promedio y los niveles de expresión génica relativa de AR, ESR1, PR, CYP19, DNMT1 Y DNMT3a en VMH, MPOA, AMG y OB.
4. La diversidad de la conducta copulatoria de la rata macho es más amplia que los endofenotipos de machos copuladores, *sluggish* y no copuladores, ya que en una muestra de machos copuladores clasificados en 4 endofenotipos por latencia y 5 por frecuencia de eyaculación se observó heterogeneidad conductual.

# BIBLIOGRAFÍA

---

1. Alexander, B. M., Stellflug, J. N., Rose, J. D., Fitzgerald, J. A. & Moss, G. E. Behavior and endocrine changes in high-performing, low-performing, and male-oriented domestic rams following exposure to rams and ewes in estrus when copulation is precluded. *J. Anim. Sci.* **77**, 1869 (1999).
2. Chivers, M. L., Rieger, G., Latty, E. & Bailey, J. M. A Sex Difference in the Specificity of Sexual Arousal. *Psychol. Sci.* **15**, 736–744 (2004).
3. Pattij, T. *et al.* Individual differences in male rat ejaculatory behaviour: searching for models to study ejaculation disorders. *Eur. J. Neurosci.* **22**, 724–734 (2005).
4. Swaab, D. F. Sexual orientation and its basis in brain structure and function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 10273–10274 (2008).
5. de Vries, G. J. & Södersten, P. Sex differences in the brain: The relation between structure and function. *Horm. Behav.* **55**, 589–596 (2009).
6. Waldinger, M. D. & Olivier, B. Animal models of premature and retarded ejaculation. *World J. Urol.* **23**, 115–118 (2005).
7. Burke, S. M., Manzouri, A. H. & Savic, I. Structural connections in the brain in relation to gender identity and sexual orientation. *Sci. Rep.* **7**, 17954 (2017).
8. Eguibar, J. R. *et al.* Differential organization of male copulatory patterns in high- and low-yawning-frequency sublimes versus outbred Sprague-Dawley rats. *Physiol. Behav.* **153**, 84–90 (2016).
9. Ponseti, J. *et al.* A functional endophenotype for sexual orientation in humans. *Neuroimage* **33**, 825–833 (2006).
10. Kinsey, A. C., Pomeroy, W. R. & Martin, C. E. *Sexual Behavior in the Human Male*. (Philadelphia, Pa: W.B. Saunders, 1948).
11. Epstein, R., McKinney, P., Fox, S. & Garcia, C. Support for a Fluid-Continuum Model of Sexual Orientation: A Large-Scale Internet Study. *J. Homosex.* **59**, 1356–1381 (2012).
12. Diamond, L. M. Sexual Fluidity in Male and Females. *Curr. Sex. Heal. Reports* **8**, 249–256 (2016).
13. Joel, D. *et al.* Sex beyond the genitalia: The human brain mosaic. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 15468–15473 (2015).
14. Balthazart, J. Sex differences in partner preferences in humans and animals. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **371**, 20150118 (2016).
15. Ventriglio, A. & Bhugra, D. *Sexuality in the 21st Century : Sexual Fluidity*. (2019).

doi:10.12809/eaap1736

16. Crews, D. The (bi)sexual brain. *EMBO Rep.* **13**, 779–784 (2012).
17. Agmo, a. Male rat sexual behavior. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* **1**, 203–9 (1997).
18. Hull, E. M. & Rodríguez-Manzo, G. Male Sexual Behavior. in *Hormones, Brain and Behavior* (ed. Pfaff, D. W.) **1**, 5–66 (Elsevier, 2009).
19. Hull, E. M. & Dominguez, J. M. Sexual behavior in male rodents. *Horm. Behav.* **52**, 45–55 (2007).
20. Ventura-Aquino, E. & Paredes, R. G. Animal Models in Sexual Medicine: The Need and Importance of Studying Sexual Motivation. *Sex. Med. Rev.* **5**, 5–19 (2017).
21. Hull, E. M., Wood, R. I. & Mckenna, K. E. Neurobiology of Male Sexual Behavior. (2006).
22. Lucio, R.A., et al. The Physiology and Ecophysiology of Ejaculation. *Trop. Subtrop. Agroecosystems* **15**, S113–S127 (2012).
23. DOMINGUEZ, J. & HULL, E. Dopamine, the medial preoptic area, and male sexual behavior. *Physiol. Behav.* **86**, 356–368 (2005).
24. Sokolowski, K. & Corbin, J. G. Wired for behaviors: from development to function of innate limbic system circuitry. *Front. Mol. Neurosci.* **5**, 1–15 (2012).
25. Will, R. G., Hull, E. M. & Dominguez, J. M. Influences of dopamine and glutamate in the medial preoptic area on male sexual behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **121**, 115–123 (2014).
26. Sakamoto, H. Brain–spinal cord neural circuits controlling male sexual function and behavior. *Neurosci. Res.* **72**, 103–116 (2012).
27. Alexander, B. M., Skinner, D. C. & Roselli, C. E. Wired on Steroids: Sexual Differentiation of the Brain and Its Role in the Expression of Sexual Partner Preferences. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2**, 1–11 (2011).
28. McCarthy, M. M., Herold, K. & Stockman, S. L. Fast, furious and enduring: Sensitive versus critical periods in sexual differentiation of the brain. *Physiol. Behav.* **187**, 13–19 (2018).
29. Pfaff, D. W. & Baum, M. J. Hormone-dependent medial preoptic/lumbar spinal cord/autonomic coordination supporting male sexual behaviors. *Mol. Cell. Endocrinol.* **467**, 21–30 (2018).
30. Wu, D. & Gore, A. C. Hormones and Behavior Changes in androgen receptor , estrogen receptor alpha , and sexual behavior with aging and testosterone in male rats. *Horm. Behav.* **58**, 306–316 (2010).



31. Hull, E. M., Muschamp, J. W. & Sato, S. Dopamine and serotonin: influences on male sexual behavior. *Physiol. Behav.* **83**, 291–307 (2004).
32. Hull, E. M. & Dominguez, J. M. Getting his act together: Roles of glutamate, nitric oxide, and dopamine in the medial preoptic area. *Brain Res.* **1126**, 66–75 (2006).
33. Parker, G. A. & Pizzari, T. Sperm competition and ejaculate economics. *Biol. Rev.* **85**, no-no (2010).
34. Lenkov, K., Lee, M. H., Lenkov, O. D., Swafford, A. & Fernald, R. D. Epigenetic DNA methylation linked to social dominance. *PLoS One* **10**, 1–11 (2015).
35. Rosvall, K. A. *et al.* Neural sensitivity to sex steroids predicts individual differences in aggression: Implications for behavioural evolution. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **279**, 3547–3555 (2012).
36. Parker, G. A. *Sperm Competition and the Evolution of Ejaculates: Towards a Theory Base. Sperm competition and Sexual selection* (ACADEMIC PRESS, 1998). doi:10.1016/B978-0-12-100543-6.50026-X
37. Olivier, B. *et al.* Psychopharmacology of male rat sexual behavior: modeling human sexual dysfunctions? *Int. J. Impot. Res.* **18**, S14–S23 (2006).
38. Antaramian, A., González-Gallardo, A., García-Ugalde, C., Portillo, W. & Paredes, R. G. Steroid Receptors and Aromatase Gene Expression in Different Brain Areas of Copulating and Sexually Sluggish Male Rats. *J. Sex. Med.* **12**, 2267–2275 (2015).
39. Portillo, W., Camacho, F., Eguibar, J. R. & Paredes, R. G. Behavioral characterization of non-copulating male rats with high spontaneous yawning frequency rate. *Behav. Brain Res.* **214**, 225–230 (2010).
40. PORTILLO, W., DIAZ, N., RETANAMARQUEZ, S. & PAREDES, R. Olfactory, partner preference and Fos expression in the vomeronasal projection pathway of sexually sluggish male rats. *Physiol. Behav.* **88**, 389–397 (2006).
41. Portillo, W. & Paredes, R. G. Sexual and olfactory preference in noncopulating male rats. *Physiol. Behav.* **80**, 155–162 (2003).
42. Borgdorff, A. J. *et al.* Differences in the Spinal Command of Ejaculation in Rapid Ejaculating Rats. *J. Sex. Med.* **6**, 2197–2205 (2009).
43. Portillo, W., Diaz, N. F., Cabrera, E. A., Fernandez-Guasti, A. & Paredes, R. G. Comparative Analysis of Immunoreactive Cells for Androgen Receptors and Oestrogen Receptor alpha in Copulating and Non-Copulating Male Rats. *J. Neuroendocrinol.* **18**, 168–176 (2006).
44. Portillo, W., Castillo, C. G., Retana-Márquez, S., Roselli, C. E. & Paredes, R. G. Neuronal Activity of Aromatase Enzyme in Non-Copulating Male Rats. *J. Neuroendocrinol.* **19**, 139–141 (2007).

45. Portillo, W. & Paredes, R. G. Sexual incentive motivation, olfactory preference, and activation of the vomeronasal projection pathway by sexually relevant cues in non-copulating and naive male rats. *Horm. Behav.* **46**, 330–340 (2004).
46. Antonio-Cabrera, E. & Paredes, R. G. Testosterone or Oestradiol Implants in the Medial Preoptic Area Induce Mating in Noncopulating Male Rats. *J. Neuroendocrinol.* **26**, 448–458 (2014).
47. Petrulis, A. Chemosignals and hormones in the neural control of mammalian sexual behavior. *Front. Neuroendocrinol.* **34**, 255–267 (2013).
48. Wheelock, M. D. *et al.* Sex differences in functional connectivity during fetal brain development. *Dev. Cogn. Neurosci.* **36**, 100632 (2019).
49. Snell, D. M. & Turner, J. M. A. Sex Chromosome Effects on Male–Female Differences in Mammals. *Curr. Biol.* **28**, R1313–R1324 (2018).
50. de Vries, G. J. & Forger, N. G. Sex differences in the brain: a whole body perspective. *Biol. Sex Differ.* **6**, 15 (2015).
51. Fine, C., Dupré, J. & Joel, D. Sex-Linked Behavior: Evolution, Stability, and Variability. *Trends Cogn. Sci.* **21**, 666–673 (2017).
52. Portillo, W. & Paredes, R. G. Motivational Drive in Non-copulating and Socially Monogamous Mammals. *Front. Behav. Neurosci.* **13**, 1–11 (2019).
53. Gottesman, I. I. & Gould, T. D. The Endophenotype Concept in Psychiatry: Etymology and Strategic Intentions. *Am. J. Psychiatry* **160**, 636–645 (2003).
54. Lenz, K. M. & Sengelaub, D. R. Maternal care effects on the development of a sexually dimorphic motor system: The role of spinal oxytocin. *Horm. Behav.* **58**, 575–581 (2010).
55. Olvera-Hernández, S., Tapia-Rodríguez, M., Swaab, D. F. & Fernández-Guasti, A. Prenatal administration of letrozole reduces SDN and SCN volume and cell number independent of partner preference in the male rat. *Physiol. Behav.* **171**, 61–68 (2017).
56. McCarthy, M. M., Nugent, B. M. & Lenz, K. M. Neuroimmunology and neuroepigenetics in the establishment of sex differences in the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* **18**, 471–484 (2017).
57. Ayala-García, B. *et al.* Speciation, Phenotypic Variation and Plasticity: What Can Endocrine Disruptors Tell Us? *Int. J. Endocrinol.* **2013**, 1–8 (2013).
58. Forger, N. G. Epigenetic mechanisms in sexual differentiation of the brain and behaviour. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **371**, 20150114 (2016).
59. Joel, D. & Fausto-Sterling, A. Beyond sex differences: new approaches for thinking about variation in brain structure and function. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **371**, 20150451 (2016).

60. Jazin, E. & Cahill, L. Sex differences in molecular neuroscience: from fruit flies to humans. *Nat. Rev. Neurosci.* **11**, 9–17 (2010).
61. McCarthy, M. M. & Nugent, B. M. At the frontier of epigenetics of brain sex differences. *Front. Behav. Neurosci.* **9**, 1–8 (2015).
62. Mosley, M. *et al.* Neonatal Inhibition of DNA Methylation Alters Cell Phenotype in Sexually Dimorphic Regions of the Mouse Brain. *Endocrinology* **158**, 1838–1848 (2017).
63. McCarthy, M. M. Is sexual differentiation of brain and behavior epigenetic? *Curr. Opin. Behav. Sci.* **25**, 83–88 (2019).
64. Rice, W. R. & Friberg, U. Homosexuality as a Consequence of Epigenetically Canalized Sexual Development Author ( s ): William R . Rice , Urban Friberg , and Sergey Gavrillets Reviewed work ( s ): Published by : The University of Chicago Press HOMOSEXUALITY AS A CONSEQUENCE OF EPIGE. (2012).
65. Balter, M. Can epigenetics explain homosexuality puzzle? *Science (80-. )*. **350**, 148–148 (2015).
66. Rice, W. R., Friberg, U. & Gavrillets, S. Homosexuality via canalized sexual development: A testing protocol for a new epigenetic model. *BioEssays* **35**, 764–770 (2013).
67. Mori, H., Matsuda, K. I., Tsukahara, S. & Kawata, M. Intrauterine Position Affects Estrogen Receptor  $\alpha$  Expression in the Ventromedial Nucleus of the Hypothalamus via Promoter DNA Methylation. *Endocrinology* **151**, 5775–5781 (2010).
68. Forbes-Lorman, R., Auger, A. P. & Auger, C. J. Neonatal RU-486 (mifepristone) exposure increases androgen receptor immunoreactivity and sexual behavior in male rats. *Brain Res.* **1543**, 143–150 (2014).
69. Nugent, B. M. *et al.* Brain feminization requires active repression of masculinization via DNA methylation. *Nat. Neurosci.* **18**, 690–697 (2015).
70. Agnvall, B. & Jensen, P. Large Sex Differences in Chicken Behavior and Brain Gene Expression Coincide with Few Differences in Promoter DNA-Methylation. **9**, (2014).
71. Leroux, S. *et al.* Embryonic environment and transgenerational effects in quail. *Genet. Sel. Evol.* 1–8 (2017). doi:10.1186/s12711-017-0292-7
72. Lenkov, K., Lee, M. H., Lenkov, O. D., Swafford, A. & Fernald, R. D. Epigenetic DNA Methylation Linked to Social Dominance. *PLoS One* **10**, e0144750 (2015).
73. Auger, A. P., Tetel, M. J. & Mccarthy, M. M. Steroid receptor coactivator-1 ( SRC-1 ) mediates the development of sex-specific brain morphology and behavior. **97**, (2000).
74. Temple, J. L., Scordalakes, E. M., Bodo, C., Gustafsson, J.-åke & Rissman, E. F. Lack of

- functional estrogen receptor  $\alpha$  gene disrupts pubertal male sexual behavior. **44**, 427–434 (2003).
75. Manuscript, A. NIH Public Access. **25**, 1299–1304 (2012).
  76. Tung, J. *et al.* Social environment is associated with gene regulatory variation in the rhesus macaque immune system. 1–6 (2012). doi:10.1073/pnas.1202734109/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1202734109
  77. Matsuda, K. I. Epigenetic changes in the estrogen receptor  $\alpha$  gene promoter : implications in sociosexual behaviors. **8**, 1–7 (2014).
  78. Arnold, A. P. & Chen, X. What does the “four core genotypes” mouse model tell us about sex differences in the brain and other tissues? *Front. Neuroendocrinol.* **30**, 1–9 (2009).
  79. Keverne, E. B. Importance of the matriline for genomic imprinting, brain development and behaviour. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **368**, 20110327 (2013).
  80. Arnold, A. P. A general theory of sexual differentiation. *J. Neurosci. Res.* **95**, 291–300 (2017).
  81. Ho-Shing, O. & Dulac, C. Influences of genomic imprinting on brain function and behavior. *Curr. Opin. Behav. Sci.* **25**, 66–76 (2019).
  82. Chan, W. F. N. *et al.* Male Microchimerism in the Human Female Brain. *PLoS One* **7**, e45592 (2012).
  83. Müller, A. C. *et al.* Microchimerism of male origin in a cohort of Danish girls. *Chimerism* **6**, 65–71 (2015).
  84. Whalen, R. *Heterotypical Behaviour in Man and Animals. Heterotypical Behaviour in Man and Animals* (Springer Netherlands, 1991). doi:10.1007/978-94-011-3078-3
  85. Joel, D. Male or Female? Brains are Intersex. *Front. Integr. Neurosci.* **5**, 1–5 (2011).
  86. Walton, M. T., Lykins, A. D. & Bhullar, N. Beyond Heterosexual, Bisexual, and Homosexual: A Diversity in Sexual Identity Expression. *Arch. Sex. Behav.* **45**, 1591–1597 (2016).
  87. Joel, D., Hänggi, J. & Pool, J. Reply to Glezerman: Why differences between brains of females and brains of males do not “add up” to create two types of brains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, E1972–E1972 (2016).
  88. Hyde, J. S. *et al.* The future of sex and gender in psychology: Five challenges to the gender binary. *Am. Psychol.* **74**, 171–193 (2019).
  89. Ringnér, M. What is principal component analysis? *Nat. Biotechnol.* **26**, 303–304 (2008).
  90. Abdi, H. & Williams, L. J. Principal component analysis. *Wiley Interdiscip. Rev.*

- Comput. Stat.* **2**, 433–459 (2010).
91. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, 45e – 45 (2001).
  92. Alvarenga, T. A., Andersen, M. L. & Tufik, S. Influence of Progesterone on Sexual Performance in Male Rats. *J. Sex. Med.* **7**, 2435–2444 (2010).
  93. Unda, N. M., Portillo, W., Corona, R. & Paredes, R. G. Sexual Stimulation Increases the Survival of New Cells in the Accessory Olfactory Bulb of the Male Rat. *Front. Neurosci.* **10**, 1–8 (2016).
  94. Petrusis, A. Chemosignals, hormones and mammalian reproduction. *Horm. Behav.* **63**, 723–741 (2013).
  95. Auclair, G. & Weber, M. Biochimie Mechanisms of DNA methylation and demethylation in mammals. *BIOCHI* **94**, 2202–2211 (2012).
  96. Sodersten, G. J. de V. and P. Sex Differences in the Brain: The Relation between Structure and Function. *Neuroendocrinology* **55**, 589–596 (2014).
  97. Sutton, C. M., Ziegler, R. L., Austin, K. J. & Alexander, B. M. Quantitative comparison of TRPM8 positively stained neurons in the hypothalamus and amygdala of rams categorized behaviorally as low or high sexual performers. *Transl. Anim. Sci.* **2**, S173–S174 (2018).
  98. Hasler, G., Drevets, W. C., Gould, T. D., Gottesman, I. I. & Manji, H. K. Toward Constructing an Endophenotype Strategy for Bipolar Disorders. *Biol. Psychiatry* **60**, 93–105 (2006).
  99. FLINT, J. & MUNAFÒ, M. R. The endophenotype concept in psychiatric genetics. *Psychol. Med.* **37**, 163–180 (2007).
  100. Walters, J. T. R. & Owen, M. J. Endophenotypes in psychiatric genetics. *Mol. Psychiatry* **12**, 886–890 (2007).
  101. Iacono, W. G., Malone, S. M., Vaidyanathan, U. & Vrieze, S. I. Genome-wide scans of genetic variants for psychophysiological endophenotypes: A methodological overview. *Psychophysiology* **51**, 1207–1224 (2014).
  102. Georgiadis, J. R. Doing it . . . wild? On the role of the cerebral cortex in human sexual activity. **1**, 1–6 (2012).
  103. Lenz, K. M. & Sengelaub, D. R. Maternal care effects on SNB motoneuron development: The mediating role of sensory afferent distribution and activity. *Dev. Neurobiol.* **69**, 603–615 (2009).
  104. Lenz, K. M. & Sengelaub, D. R. Maternal licking influences dendritic development of motoneurons in a sexually dimorphic neuromuscular system. *Brain Res.* **1092**, 87–99 (2006).

105. Paredes R. Medial preoptic area / anterior hypothalamus and sexual motivation. *Scand. J. Psychol.* **44**, 203–212 (2003).
106. Young, L. J. & Pike, R. Progesterone Modulation of Androgen-Dependent Sexual Behavior in Male Rats. **9384**, 307–313 (1995).
107. Portillo, W. *et al.* Sexual activity increases the number of newborn cells in the accessory olfactory bulb of male rats. *Front. Neuroanat.* **6**, 1–9 (2012).
108. Peretto, P., Schellino, R., De Marchis, S. & Fasolo, A. The Interplay between Reproductive Social Stimuli and Adult Olfactory Bulb Neurogenesis. *Neural Plast.* **2014**, 1–11 (2014).
109. Noh, K. *et al.* Engineering of a Histone-Recognition Domain in Dnmt3a Alters the Epigenetic Landscape and Phenotypic Features of Mouse ESCs Article Engineering of a Histone-Recognition Domain in Dnmt3a Alters the Epigenetic Landscape and Phenotypic Features of Mouse ESCs. *Mol. Cell* **59**, 89–103 (2015).
110. Nashun, B., Hill, P. W. S. & Hajkova, P. Reprogramming of cell fate : epigenetic memory and the erasure of memories past. **34**, 1296–1309 (2015).
111. Morris, M. J. & Monteggia, L. M. *Translational research*. 359–371 (2014).
112. Heyward, F. D. & Sweatt, J. D. DNA methylation in memory formation : Emerging insights. **21**, 475–489 (2016).
113. Oliveira, A. M. M. DNA methylation : a permissive mark in memory formation and maintenance. 587–593 (2016).
114. Jr, W. M. *Data Mining and Analysis : Fundamental Concepts and Algorithms*. 1–13
115. Sedgwick, P. & George, S. Pearson’s correlation coefficient. (2016). doi:10.1136/bmj.e4483
116. Schober, P. & Boer, C. Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation. (2018). doi:10.1213/ANE.0000000000002864
117. Coria-Avila, G. A. The role of conditioning on heterosexual and homosexual partner preferences in rats. *Socioaffective Neurosci. Psychol.* **2**, 17340 (2012).
118. Wu, M. V. & Shah, N. M. Control of masculinization of the brain and behavior. *Curr. Opin. Neurobiol.* **21**, 116–123 (2011).
119. Burmeister, M., McInnis, M. G. & Zöllner, S. Psychiatric genetics: progress amid controversy. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 527–540 (2008).
120. Santtila, P. *et al.* The Dopamine Transporter Gene (DAT1) Polymorphism is Associated with Premature Ejaculation. *J. Sex. Med.* **7**, 1538–1546 (2010).
121. Chen, J. The pathophysiology of delayed ejaculation. *Transl. Androl. Urol.* **5**, 549–562

- (2016).
122. Veening, J. G. & Coolen, L. M. Neural mechanisms of sexual behavior in the male rat: Emphasis on ejaculation-related circuits. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **121**, 170–183 (2014).
  123. Damassa, D. A., Smith, E. R., Tennent, B. & Davidson, J. M. The relationship between circulating testosterone levels and male sexual behavior in rats. *Horm. Behav.* **8**, 275–286 (1977).
  124. Shulman, L. M. & Spritzer, M. D. Changes in the sexual behavior and testosterone levels of male rats in response to daily interactions with estrus females. *Physiol. Behav.* **133**, 8–13 (2014).
  125. Morgentaler, A. *et al.* Delayed Ejaculation and Associated Complaints: Relationship to Ejaculation Times and Serum Testosterone Levels. *J. Sex. Med.* **14**, 1116–1124 (2017).
  126. Antonio-Cabrera, E. & Paredes, R. G. Effects of chronic estradiol or testosterone treatment upon sexual behavior in sexually sluggish male rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **101**, 336–341 (2012).
  127. Data, B. & Data, B. Correlación no implica causalidad. 88–90 (2016).

# ANEXO 1

---

Copia del artículo publicado





# Male Ejaculatory Endophenotypes: Revealing Internal Inconsistencies of the Concept in Heterosexual Copulating Rats

Itztlí Trejo-Sánchez<sup>1,2\*</sup>, Carlos Pérez-Monter<sup>3</sup>, Sofía Huerta-Pacheco<sup>4</sup> and Gabriel Gutiérrez-Ospina<sup>1,5\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Biología de Sistemas, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Biología Celular y Fisiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, <sup>2</sup> Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Unidad de Posgrado, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, <sup>3</sup> Departamento de Gastroenterología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", Mexico City, Mexico, <sup>4</sup> Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Ciencia Forense, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, <sup>5</sup> Coordinación de Psicobiología y Neurociencias, Facultad de Psicología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Osborne F. X. Almeida,  
Max Planck Institute of Psychiatry  
(MPI), Germany

### Reviewed by:

Elaine M. Hull,  
Florida State University, United States  
Daphna Joel,  
Tel Aviv University, Israel

### \*Correspondence:

Itztlí Trejo-Sánchez  
itztli@comunidad.unam.mx;  
itztli.gts@gmail.com  
Gabriel Gutiérrez-Ospina  
gabo@iibimedicas.unam.mx

### Specialty section:

This article was submitted to  
Behavioral Endocrinology,  
a section of the journal  
Frontiers in Behavioral Neuroscience

**Received:** 19 August 2019

**Accepted:** 14 May 2020

**Published:** 26 June 2020

### Citation:

Trejo-Sánchez I, Pérez-Monter C,  
Huerta-Pacheco S and  
Gutiérrez-Ospina G (2020) Male  
Ejaculatory Endophenotypes:  
Revealing Internal Inconsistencies  
of the Concept in Heterosexual  
Copulating Rats.  
Front. Behav. Neurosci. 14:90.  
doi: 10.3389/fnbeh.2020.00090

Distinct manifestations of sexual behavior are conceived as separate phenotypes. Each sexual phenotype is assumed to be associated with a characteristic brain. These notions have justified the phenotyping of heterosexual copulator males based upon their ejaculation's latencies (EL) or frequencies (i.e., cumulative ejaculation number; EN). For instance, men and male rats showing premature, normal or retarded ejaculation are assumed to be distinctive endophenotypes. This concept, nonetheless, contradicts past and recent evidence that supports that sexual behavior is highly variable within each sex, and that the brain sexual functional morphology represents an intricate sexual phenotypic mosaic. Hence, for ejaculatory male endophenotypes to be considered as a valid biological concept, it must show internal consistency at various levels of organization (including genetic architectures), after being challenged by intrinsic and/or extrinsic factors. We then judged the internal consistency of the presumed ejaculatory endophenotypes by assessing whether copulatory behavior and the expression of copulation relevant genes and brain limbic structures are specific to each of the presumed EL- or EN-ejaculatory endophenotypes. To do this, copulating male rats were first phenotyped in groups consistently displaying short, average or long ejaculation latencies or very high, high, average, low or very low EN, based in their copulatory performance. Then, the internal consistency of the presumed EL- or EN-endophenotypes was tested by introducing as covariates of phenotyping other copulatory parameters (e.g., number of intromissions) in addition to EL or EN, or by analyzing the expression levels of genes encoding for estrogen receptor alpha, progesterone receptor, androgen receptor, aromatase, DNA methyl-transferase 3a and DNA methyl-transferase 1 in the amygdala, medial preoptic area, ventromedial hypothalamus and olfactory bulb. We found that even though there were group-level

differences in all the variables that were studied, these differences did not add-up to create the presumed EL- or EN-ejaculatory endophenotypes. In fact, the extensive overlapping of copulatory parameters and expression levels of copulation relevant genes in limbic structures across EL- or EN-phenotyped copulating male rats, is not consistent with the hypothesis that distinct ejaculatory endophenotypes exist and that they are associated with specific brain characteristics.

**Keywords: sexual diversity, sexual phenotypes, sexual brain, male copulatory behavior, sexual continuum, sexual fluidity, brain mosaic, sexual behavior**

## INTRODUCTION

Distinct manifestations of sexual behavior (e.g., female/male heterosexuality, male/female homosexuality; female/male bisexuality and so forth) are long thought to represent separate phenotypes (Chivers et al., 2004; de Vries and Södersten, 2009; Jordan, 2010; Cerny and Janssen, 2011; Flanagan-Cato, 2011; Rosenthal et al., 2011, 2012; Balthazart, 2016; Joel and Fausto-Sterling, 2016; Portillo and Paredes, 2019). This notion not only embraces the behavioral display of the individuals sharing distinct sexual expressions, but also the presumption that the brain of each phenotypic group displays functional morphological attributes that are specific to each sexual phenotype (Zhou et al., 1995; Fernández-Guasti et al., 2000; Kruijver et al., 2000; Savic et al., 2005, 2010; Berglund et al., 2006; Swaab, 2008; Sakamoto, 2012; Rahman and Yusuf, 2015; Taziaux et al., 2016; Burke et al., 2017; Amezcua-Gutiérrez et al., 2018). Accordingly, in humans, it has been reported that (1) the functional organization of the brain of heterosexual women and men differs importantly from each other (Savic and Lindstrom, 2008), (2) that the brain's functional organization of homosexual men and women differs one another with the former laying closer to the brain's organization reported for heterosexual females, and the latter nearer to that reported for heterosexual males (Savic and Lindstrom, 2008), and (3) that the brain's functional organization of bisexual individuals charts somewhere in between the brain organization reported for monosexual, hetero- or homo-sexual men (Safron et al., 2017). A similar scenario has been drawn for hypersexual (Absher, 2016), asexual (Prause and Harenski, 2014) and transsexual (Garcia-Falgueras and Swaab, 2008) individuals. At least some of these phenotypes are presumed to result from specific genetic architectures (e.g., Arnold and Chen, 2009; Ngun et al., 2011; Arnold, 2017), hormonal (e.g., Wilson et al., 1981; de Vries and Södersten, 2009; Hines, 2010; Olvera-Hernández and Fernández-Guasti, 2015) and epigenetic (Rice et al., 2013; McCarthy and Nugent, 2015; Nugent et al., 2015, 2017; Forger, 2016; Mosley et al., 2017; McCarthy, 2019) makeups, so they may be considered as endophenotypes (e.g., Rahman, 2005; Ponseti et al., 2006).

The construct that claims the existence of distinct sexual phenotypes is not applied only to human beings, but also to other animal species (for a comprehensive review see de Vries and Södersten, 2009; also Jazin and Cahill, 2010; Forger, 2016; Ventura-Aquino and Paredes, 2017; LaClair et al., 2019). In this regard, female- or male-preferring male rats (Coria-Avila, 2012;

Coria-Avila et al., 2014; Olvera-Hernández and Fernández-Guasti, 2015) and rams (Alexander et al., 1993, 1999; Borja and Fabre-Nys, 2012; Sutton et al., 2018), as well as copulating and non-copulating male rats (Portillo and Paredes, 2003, 2019; Portillo et al., 2006a,b; Ventura-Aquino and Paredes, 2017) are good examples to keep in mind because they are thought to represent distinct copulatory phenotypes associated each to a characteristic brain. Accordingly, previous studies sustain that the expression levels of sexually relevant genes such as those encoding estrogen, progesterone and androgen receptors and the enzyme aromatase in the amygdala, medial preoptic area and the olfactory bulb, distinctively differ between non-copulating and copulating male rats (Portillo et al., 2006a,b; Antaramian et al., 2015), even though serum testosterone levels does not differ between them (Portillo et al., 2010). This last observation is not surprising since it has been long known that under physiological conditions, in male rats, ejaculation is minimally affected by testosterone (Whalen et al., 1961), there is a limited correlation between circulating testosterone and sexual behavior (Damassa et al., 1977), chronic sexual activity does not predict testosterone concentration (Shulman and Spritzer, 2014; see also Portillo et al., 2010) and there is no association between ejaculation times and testosterone levels (Morgentaler et al., 2017).

In relatively recent times, the idea that males, at least in mammals, display distinct ejaculatory endophenotypes has been proposed. Indeed, it is said, for instance, that men and male rats showing premature, normal or retarded ejaculation represent distinctive endophenotypes (Pattij et al., 2005; Waldinger and Olivier, 2005; Olivier et al., 2006; Ventura-Aquino and Paredes, 2017). These claims come across in spite of the long-held recognition that, with regard to sexual traits, intrasexual variability is as large as intersexual variability (Whalen, 1991), that the origin of brain sexual differences within and across sexual populations is multifaceted (McCarthy et al., 2018) and that there might be a continuum of sexual traits (Epstein et al., 2012; Walton et al., 2016) that could explain sexual fluidity (Diamond, 2016; Diamond et al., 2017; Luoto et al., 2019) within and across the sexes. In addition, ejaculatory endophenotypes, as it is the case for other endophenotypes (e.g., Gottesman and Gould, 2003; Burmeister et al., 2008; Iacono et al., 2014; Jonas and Markon, 2014; for critical reviews see Flint and Munafò, 2007; Walters and Owen, 2007), are even alleged to be genetically determined (Pattij et al., 2005; Waldinger and Olivier, 2005; Olivier et al., 2006; Santtila et al., 2010; Abdel-Hamid and Ali, 2018; Olivier and Olivier, 2019), and therefore they must be the

heritable, state-independent, and largely immune to social context and sexual experience once the ejaculatory pattern has been established. In addition, ejaculatory endophenotypes might also be associated to characteristic brains (Ozcan et al., 2001; Waldinger and Schweitzer, 2005; Hyun et al., 2008; Chen, 2016; Zhang et al., 2017; Yang et al., 2018). This last view is also at odds with data showing that (1) individual brains are sexually mutable, mosaic-type variations of a common brain design (Joel, 2011, 2012; Joel et al., 2015; Joel and Fausto-Sterling, 2016), (2) there exists an intersexual nature of neuroendocrinological, behavioral and psychosocial traits at least between males and females (de Vries and Södersten, 2009; Crews, 2012; Joel, 2012; Joel and Yankelevitch-Yahav, 2014; Hyde et al., 2019), (3) maternally and paternally, mono- or biallelic genomic imprinted cells populate and continuously adjust their gene expression patterns following a mosaic, intersexed pattern (Keverne, 2013; Ho-Shing and Dulac, 2019), (4) functional neuronal circuits underlying male- or female-specific behavior coexist in normal female or male mouse brains (de Vries and Södersten, 2009), and (5) genes may not allow meaningful prediction of individual sexual preference (Ganna et al., 2019). Clearly, the internal consistency of the presumption supporting the existence of male ejaculatory endophenotypes must be independently confirmed.

We then assumed this task by using heterosexual, copulator male rats phenotyped based upon their ejaculation latency (EL) or number (EN), after being tested in copulatory contests (e.g., Pattij et al., 2005). Then, the internal consistency of the presumed ejaculatory phenotypes was assessed by introducing as covariates of phenotyping other copulatory parameters in addition to EL or EF and the expression levels of estrogen receptor alpha (ESR1), progesterone receptor (PR), androgen receptor (AR), aromatase (CYP19), DNA methyl-transferase 3a (DNMT3a) and DNA methyl-transferase 1 (DNMT1) in the amygdala (AMG), medial preoptic area (MPOA), ventromedial hypothalamus (VMH) and olfactory bulb (OB), all gene products and brain areas involved in the regulation of male copulation and ejaculation (Holstege et al., 2003; Hull and Dominguez, 2007; Hull and Rodríguez-Manzo, 2009); these genes and brain regions are particularly important since ejaculation as a potential endophenotypic trait, is a subprocess of copulation. So, if ejaculatory endophenotypes were internally consistent, both copulatory behavior and the expression patterns of sexually relevant genes in the limbic structures evaluated should be reasonably specific to each of the presumed, male ejaculatory endophenotypes. We found that even though there were group-level differences in all the variables that were studied, these differences did not add-up to create the presumed, EL- or EN-ejaculatory endophenotypes. Hence, the overlapping of the copulatory parameters and expression levels of copulation relevant genes in limbic structures across the EL- or EN-phenotyped male rats, reveals an intrinsic inconsistency of the concept that presumes the existence of ejaculatory endophenotypes in male rats. Contrary to the prediction, all copulating male rats seem to have sexual behavior displays and brain phenotypes shared by most of the presumed ejaculatory endophenotypes.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Sexually naïve male (250–300 g;  $n = 50$ ) and female (200–250 g;  $n = 50$ ) Wistar rats were provided by the colony sheltered by the Unidad de Modelos Biológicos at the Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). After 3 days of handling, randomly selected animals were housed in groups of five individuals per cage and kept in a room at 25°C under inverted 12/12 h, light-dark cycles (lights off at 7:00 AM). At all times, rats had free access to standard rat chow and water. Female rats were bilaterally ovariectomized under general anesthesia. After full recovery (1 week later), they were primed, for 1 week, with estradiol benzoate injected subcutaneously (25 µg; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States) every 48 h. The primed females were rendered sexually receptive by administering to them progesterone (1 mg; Sigma-Aldrich), 3–4 h before conducting the copulatory tests. Animal handling and experimental procedures followed the Mexican official norm NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales del laboratorio.” In addition, all the procedures were approved by the Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales del Laboratorio (Permit No. 163) at IIB, UNAM.

### Copulatory Tests and Male Phenotyping

Six monandrous copulatory tests, one per week, were scheduled for each sexually naïve copulating male. Under this training scheme, male rats commonly achieve consistent copulatory performance after four successful copulatory encounters (i.e., achieve ejaculation) with receptive females (Pattij et al., 2005; Olivier and Olivier, 2019); consistent copulatory performance changes little over time (Olivier et al., 2006; Olivier and Olivier, 2019), even under conditions that expose males to increasing sexual experience (Thonhauser et al., 2019). All tests (each lasting 30 min; Pattij et al., 2005) were conducted under red dim light, during the dark phase of the day/night cycle. As each session progressed, the observer recorded ejaculation (EL), mount (ML), intromission (IL) latencies and numbers. Then, EL, ML, and IL means per animal were estimated based on the values obtained in every ejaculatory series along the six copulatory tests. Latency values represent the number of seconds that elapses from the introduction of the female into the copulatory arena until the moment in which the male executes the first mount, intromission or ejaculation. Ejaculation (EN), mount (MN), or intromission (IN) cumulative numbers [i.e., ejaculation frequency (EF)] were also estimated, by adding up the number of ejaculations, mounts or intromission recorded during the six copulatory tests. We then phenotyped males based upon EL, as previously described (Olivier et al., 2006). Rapid (EL < 300 s; 20%), normal (EL 300–600 s; 46%), slow (EL > 600–900 s; 22%) or sluggish (EL > 900 s; 12%) copulators were identified and grouped them accordingly; keeping this phenotyping is important because the present work intends to challenge those published earlier (Pattij et al., 2005; Olivier et al., 2006; Olivier and Olivier, 2019). We also assayed

EN as a copulatory variate of phenotyping (Pattij et al., 2005; see also **Supplementary Material**). When EN was used to phenotype, male rats were identified as very high (VH;  $\geq 20$  ejaculations, 12%), high (H; 16–19 ejaculations, 20%), average (AV; 11–15 ejaculations, 40%), low (L; 6–10 ejaculations, 20%) and very low (VL; 1–5 ejaculations, 8%) ejaculators.

## Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)

### Sample Collection

All male rats were anesthetized and sacrificed by decapitation, just a week after their last copulatory encounter took place. The brains were rapidly removed and frozen. The AMG, OB, MPOA, and VMH were all dissected according to previous procedures (Antaramian et al., 2015). Brain samples were each immersed in separate sterile, RNase-free microfuge tubes containing 300  $\mu$ l of TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, CA, United States) and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ . RNA extraction was achieved following the manufacturer's recommendations (Life Technologies). RNA integrity was assessed by electrophoresing samples through 1% agarose gels. RNA concentration was estimated through spectrophotometry (Nano Drop 2000; Thermo Scientific; Wilmington, DE, United States).

### Single Strand Complementary DNA (cDNA) Synthesis

cDNA synthesis was achieved by using the Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) Reverse Transcriptase Kit from Promega (Madison, WI, United States). Briefly, we prepared a working solution containing (per reaction): total RNA (2  $\mu$ g), oligo dT (50  $\mu$ M; Roche) and random primers (1.2 mM; Roche) diluted in RNase free water (final volume of 15  $\mu$ l). The reaction tubes were heated at  $65^{\circ}\text{C}$  for 5 min, then cooled on ice and supplemented with the reaction mix (10  $\mu$ l) containing dNTP mix (10 mM), M-MLV reaction buffer 5X (5  $\mu$ l), M-MLV (200 U) diluted in RNase free water (final volume 25  $\mu$ l). All the reaction tubes were incubated at  $25^{\circ}\text{C}$  for 10 min. The temperature used for cDNA synthesis was  $55^{\circ}\text{C}$  for 30 min; cDNA samples obtained were then stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### qPCR Protocol

We estimated the expression levels of ESR1, PR, AR, CPY19, DNMT3a, and DNMT1 genes by implementing qPCRs using primers designed based on the sequences reported for each gene in the Probe Finder Data Base (**Table 1**; Universal Probe Library Roche Mannheim, Germany). Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta was used as the housekeeping gene (Norm Finder software; Department of Molecular Medicine Aarhus University Hospital, Denmark). Quantitative PCRs were conducted per area in each rat. To make them comparable throughout the population, we always used equal amounts of cDNA across different brain areas and individuals; non-diluted and diluted 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 standards were used to better calibrate the assays. Also, because we wanted to evaluate the behavior of individual data sets relative to the entire population, the results of each rat were compared versus those obtained from a single standard per area produced by the pooling of all

of the corresponding samples (Pfaffl, 2001). All qPCR reactions were performed in duplicate using a 96-well plate format (Light Cycler 480; Roche). Each reaction tube was filled with a solution containing cDNA (2  $\mu$ l), forward and reverse primers (oligo T4; 300 nM), Light Cycler 480 Probes Master Mix 2X (5  $\mu$ l; Roche), Probe (1  $\mu$ M; Roche), diluted in molecular grade water (final volume 10  $\mu$ l). The  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  method was used to estimate relative levels of gene expression (Pfaffl, 2001). The qPCR conditions used for each gene are shown in **Table 1**. Lastly, it is worth mentioning that the expression of the genes selected here has been previously considered as sexually relevant since they are assumed to underlie, at least in part, differences in sexual performance observed between copulating and non-copulating male rats (Antaramian et al., 2015). In this work, we instead targeted EL- (rapid, normal, slow, and sluggish) or EN- (VH, H, AV, L, and VL ejaculators) phenotyped copulating males.

## Statistical Analysis

The results reported were obtained from two cohorts of 25 male rats each. Sexually naïve, non-phenotyped males ( $n = 50$ ) were tested in six copulatory encounters (see copulatory test and male categorization in the Materials and Methods section) aimed at classifying them based on EL or EN, as previously reported (Pattij et al., 2005). We recorded, per male rat, the following copulatory parameters: latencies of mount, intromission and ejaculation (in seconds), and the accumulated number of mounts, intromissions and ejaculations, for each ejaculatory series performed in every copulatory test, each one spanning 30 min. We first evaluated the distribution of copulatory parameters across the population through Shapiro–Wilk's test (**Supplementary Figure S1**). As shown in **Supplementary Figure S1**, ejaculation latency (EL) and intromission latency (IL) did not pass the normality tests ( $p > 0.05$ ). For this reason, non-parametric tests (Kruskal–Wallis and *U*-Mann–Whitney) were used later to evaluate differences between defined endophenotypes when covariates of phenotyping were added (see below). The copulating male rats were classified as rapid (EL < 300 s), normal (EL 300–600 s), slow (EL > 600–900 s) or sluggish (EL > 900 s) based upon the EL mean value obtained after averaging all ejaculatory series per male. Also, each copulating male rat was phenotyped as very high ( $\geq 20$  ejaculations), high (16–19 ejaculations), average (11–15 ejaculations), low (6–10 ejaculations), and very low (1–5 ejaculations) according to the number of cumulative ejaculations across the copulatory tests. The overall distribution around the measure of central tendency and the internal consistency of the EL- or EN-ejaculatory endophenotypes was first tested by introducing as covariates of phenotyping any other of the copulatory parameters (IL, ML, IN, and MN); the relationships between EL- or EN-endophenotypes and each covariate were represented through boxplots and probability density plots (**Figure 1A** for EL-phenotyped rats and **Supplementary Figure S2B** for EN-phenotyped rats). We then applied Kruskal–Wallis' tests to evaluate inter-phenotype overlapping, an indicator of inter-phenotype inconsistency, considering a  $p$ -value less than 0.001. Then, we used *U*-Mann–Whitney's tests to evaluate whether a particular endophenotype differed significantly from the

**TABLE 1** | PCR probe sequences and amplification conditions.

Gene (No. GenBank)		Oligonucleotides	Size product	Probe No. <sup>2</sup>	Ta°C	Dilution	Efficiency	Slope
3-Monooxygenase/tryptophan	Ywhaz	5'-ctaccgctacttgctgagg-3'	63 nt <sup>1</sup>	9	6058	Non-diluted	2.3	-2.7
5-monooxygenase activation protein zeta	BC094305	3'-tgtgactggctccacaattcc-5'					2.1	-3.1
Androgen receptor	AR	5'-ggcgcttctaccagctca-3'	68 nt	128	60	1:10	2.2	-2.7
	NM_012502.1	3'-gaattgatgcagctctcttcg-5'						
Estrogen receptor alpha	ESR1	5'-ttctttaagagaagcattcaagga-3'	72 nt	130	60	Non-diluted	2.1	-3.0
	NM_012689.1	3'-ttatcgatggtgcattggtt-5'						
Progesterone receptor	PR	5'-ggcagctgcttccagtagtca-3'	70 nt	53	58	1:10	1.9	-3.5
	NM_022847.1	3'-tggtcatcgatgtaagttcc-5'						
Aromatase	CYP19	5'-ggaaatccacactgttgg-3'	77 nt	9	60	Non-diluted	2.0	-3.1
	NM_017085.2	3'-tgaagtttccaccacttcaa-5'						
DNA methyl-transferase 1	DNMT1	5'-aactgcttgggttgagacct-3'	75 nt	55	60	1:100	1.8	-3.7
	NM_053354.3	3'-gcgactgcaatacacactgaa-5'						
DNA methyl-transferase 3a	DNMT3a	5'-aacggaagcgggatgagt-3'	70 nt	75	58	1:100	2.1	-2.9
	NM_001003958.1	3'-actgcaatcaccttgctt-5'						

<sup>1</sup>Nucleotides. <sup>2</sup>Probe number for Universal Probe Library Roche.

preceding or the coming endophenotype within the order sequence (e.g., rapid vs. normal, normal vs. slow, and slow vs. sluggish). Only EL or EN classification has significant differences among pair comparisons of endophenotypes. To test further the internal consistency of the presumed EL- or EN-ejaculatory endophenotypes, we examined the endophenotype stability after introducing the entire set of interactions established among all copulatory parameters considered in the study by using principal component analyses (PCA). Since the copulatory parameters were measured in seconds or frequency, we decided to center and scale the data set. The results were graphed in PCA biplots (**Figure 3** for EL-phenotyped rats and **Supplementary Figure S3** for EN-phenotyped rats). Additional PCA-backup analyses are presented in **Supplementary Figure S5**. Lastly, because all the previous analyses indicated that the presumed EL- or EN-copulatory endophenotypes progressively lose internal consistency as the number of copulatory parameters introduced in the analyses increases, we decided to evaluate the degree of similarity (clustering analysis based on Euclidean distance) among the previously EL- or EN- phenotyped copulating males by using a complete-linkage dendrogram. After this, we identified the percentage of presence of the different phenotypes (covariate) in every cluster (**Figure 4A** for EL-phenotyped males and **Supplementary Figure S4A** for EN-phenotyped males). We also evaluated the degree of similarity (clustering analysis based on Euclidean distance) among EL-or EN-phenotyped copulating males by combining complete linkage cluster dendrograms and heat map for all the relative expression levels of ESR1, PR, AR, CPY19, DNMT3a and DNMT1 in AMG, MPOA, VMH and OB (**Figure 4B** for EL-phenotyped males and **Supplementary Figure S4B** for EN-phenotyped males). Again, before entering the data into the analyses, all units used to record copulatory parameters and relative gene expression levels were centered and scaled. The complete linkage clustering technique employed here uses an agglomerative nesting clustering algorithm in which each object is initially considered as a single-element cluster. At each step of the algorithm, the two clusters that

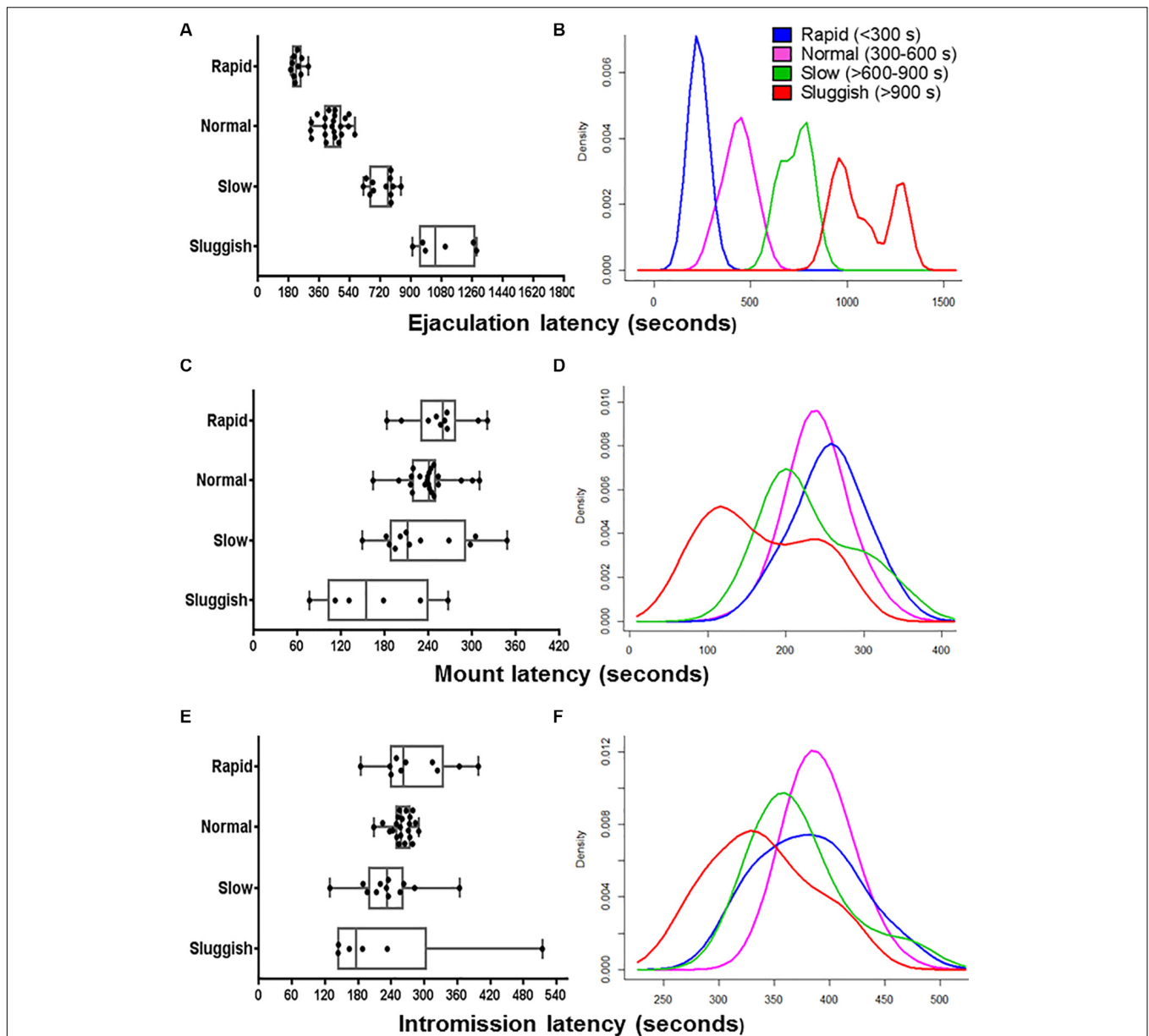
are the most similar are combined into a new bigger cluster to form nodes. This procedure is iterated until all points are member of just one single big cluster known as root. The result is a tree build up from the bottom to the top that can be plotted as a dendrogram. In this way, the analysis computes all pairwise similarities across the elements placed in different clusters along the hierarchy, and considers the maximum value of these similarities as the measured of the distance between clustered pairs of observations. To combine heat maps with complete linkage cluster dendrograms, we executed the script reported in the following link: <https://github.com/ItzliSanchez/Trejo-Sanchez-2020.git>. We also used Graph Pad Prism 6 software (La Jolla, CA, United States<sup>1</sup>) to generate boxplots and the other statistical analyses were computed and graphed using R Core Team (2020). The entire data sets are publicly available in Trejo-Sánchez (2020): Dataset of male rat copulatory behavior. figshare. Dataset. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.12108984.v1>.

## RESULTS

### Phenotyping Using a Single Copulatory Parameter Masks Internal Inconsistencies of Male Copulatory Endophenotypes

To evaluate the internal consistency of the copulatory endophenotypes, we analyzed the distribution of rapid, normal, slow, and sluggish male rats after introducing ML, IL, EN, MN, or IN as co-variates. As shown in the boxplot and probability density plot showed in **Figures 1, 2**, EL-endophenotypes were not internally consistent since virtually all of them become overlapped when any of the other copulatory parameters were introduced in the analyses. With regard to the hypothesis that

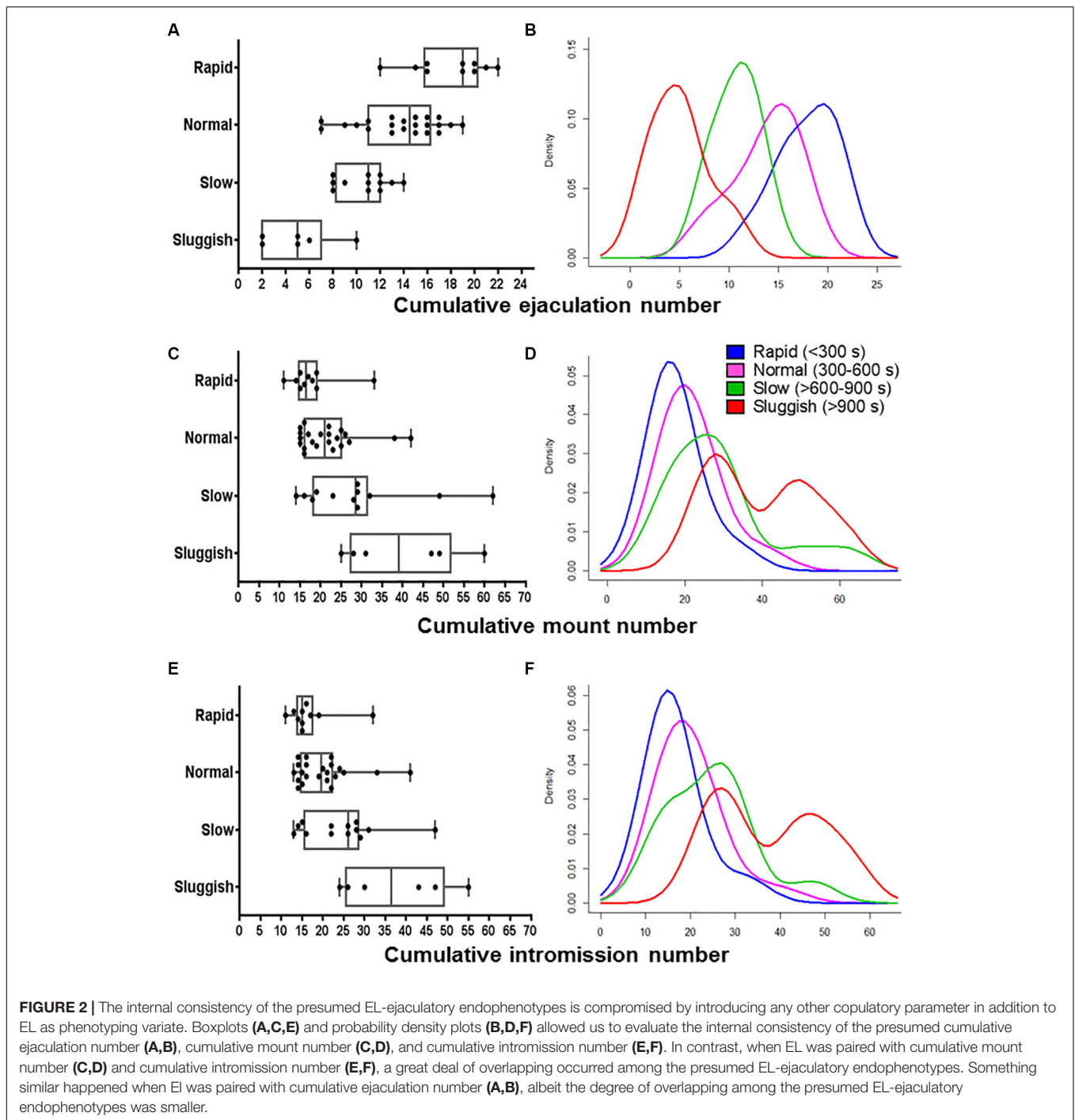
<sup>1</sup>[www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)



ejaculatory endophenotypes exist, even though Kruskal–Wallis’ tests showed statistically significant differences ( $p < 0.001$ ) among all EL- or EN-copulatory endophenotypes, *U*-Mann–Whitney’s tests showed no statistically significant differences when a specific endophenotype is compared with the preceding or the coming endophenotypes along the ordered sequence. Accordingly, sluggish and slow, slow and normal, normal and rapid were not significantly different ( $p > 0.001$ ) for the four copulatory parameters considered (IL, ML, IN, and MN) in the

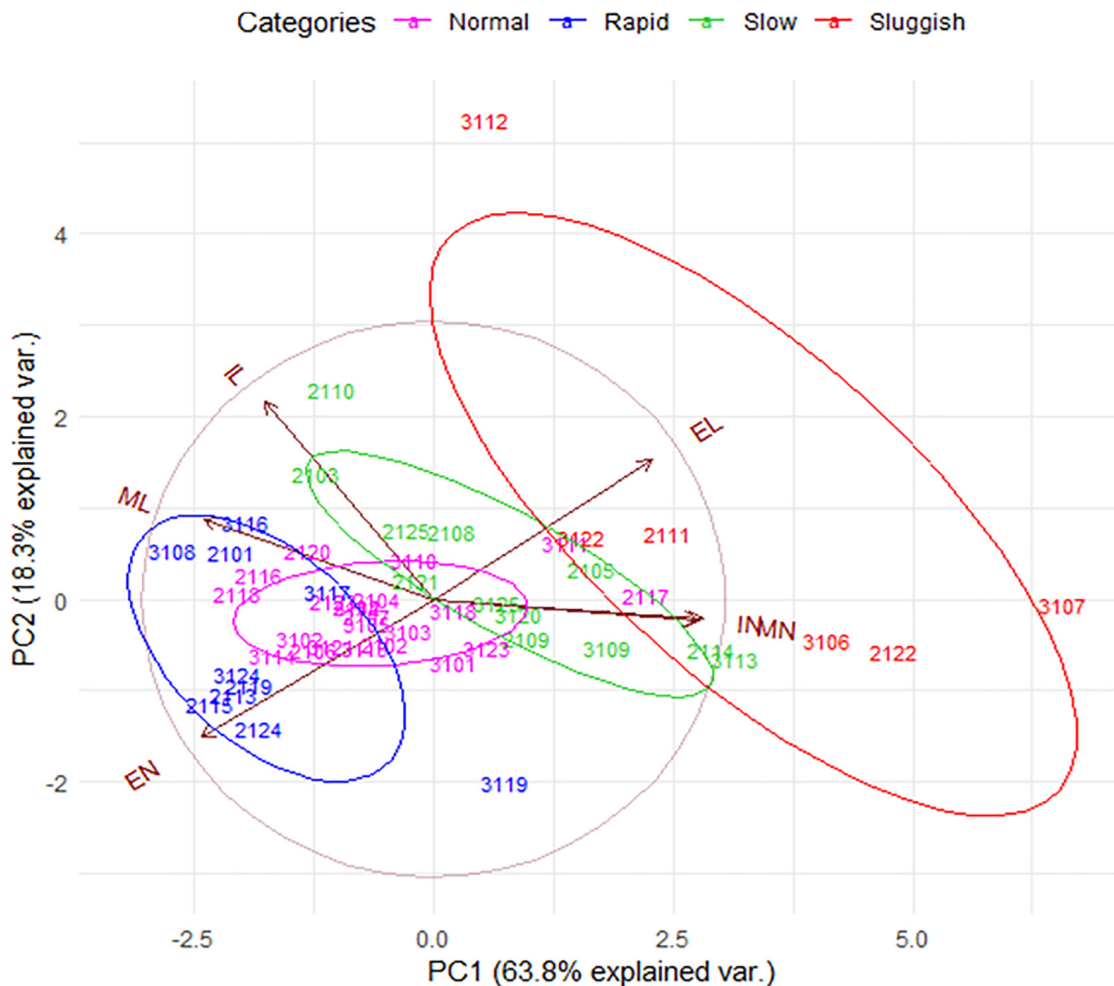
analyses. A similar result was observed in EN-phenotyped males (Supplementary Figure S2). Thus, phenotyping based on a single, optimized copulatory parameter of reference over-reduces the complexity of male’s copulatory behavior, thus leading to uncertain conclusions.

To further evaluate the internal consistency of EL-based male phenotyping, we conducted a PCA in which all copulatory parameters were introduced as variables. In PCA plots, the relative position of each EL-endophenotyped male throughout



the graphical space and his relatedness to the rest of the other males across the sampled population is defined by the interactions of the copulatory variables established among them. As seen in **Figure 3**, even though EL-phenotyped males tend to form loose groups across the graphical space, 92% of them share a common probabilistic space. The exceptions are four out of six sluggish males that comprise the 8% of the sample. A similar result was observed after phenotyping males based on their EN (**Supplementary Figure S3**). Hence, although there

might be copulator males whose phenotypes might indeed group closely when classified based on the EL or EN, male rat copulatory behavior is much more variable with males showing various degrees of “short to delayed” ELs and/or of “reduced to high” ENs. Possibly, this diversity will even be greater as more parameters (e.g., individual gene expression patterns or individual sex hormones levels) are added to the analyses. As our results stand, it seems that male copulatory endophenotypes are not separate entities. Instead, the variability of copulatory



**FIGURE 3 |** The internal consistency of the presumed EL-ejaculatory endophenotypes is compromised by introducing the entire set of copulatory parameters to phenotype copulating males. Principal component analyses biplot that allowed us to evaluate the internal consistency of the presumed EL-ejaculatory endophenotypes after introducing all copulatory parameters as covariates of phenotyping. Notice that the way copulatory parameters interact one another per copulating male rat tends to be similar regardless of the EL-ejaculatory phenotype each were assigned to. This circumstance leads to a distribution characterized by a strong overlapping of copulating male rats assigned to either of the presumed EL-ejaculatory endophenotypes; most of them share the same space in the graph (gray circle). The exception being a handful of sluggish copulating males. However, the phenotypic variation among them is so high, that envisioning them as representing true endophenotypes is untenable; they might be better seen as outliers. Also notice that 82.1% of the population variance was explained by PC1 and PC2. Copulating male rats assigned to the presumed EL-ejaculatory endophenotypes are numbered and color-coded differentially; the color-key is placed at the upper edge of the PCA biplot. Copulating male rats assigned to the same ejaculatory endophenotype are enclosed by elliptical traces of the same color; the greater the ellipse area, the highest the estimated intra-categorical variability. Vectors represent copulatory parameters; the closer the angle between vectors, the higher their correlation. Complementary information on PCA is shown in **Supplementary Figure S5**. PC1: Principal component one; PC2: Principal component two. EL, ejaculation latency; EN, cumulative ejaculation number; IL, intromission latency, IN, cumulative intromission number; MN, cumulative mount number.

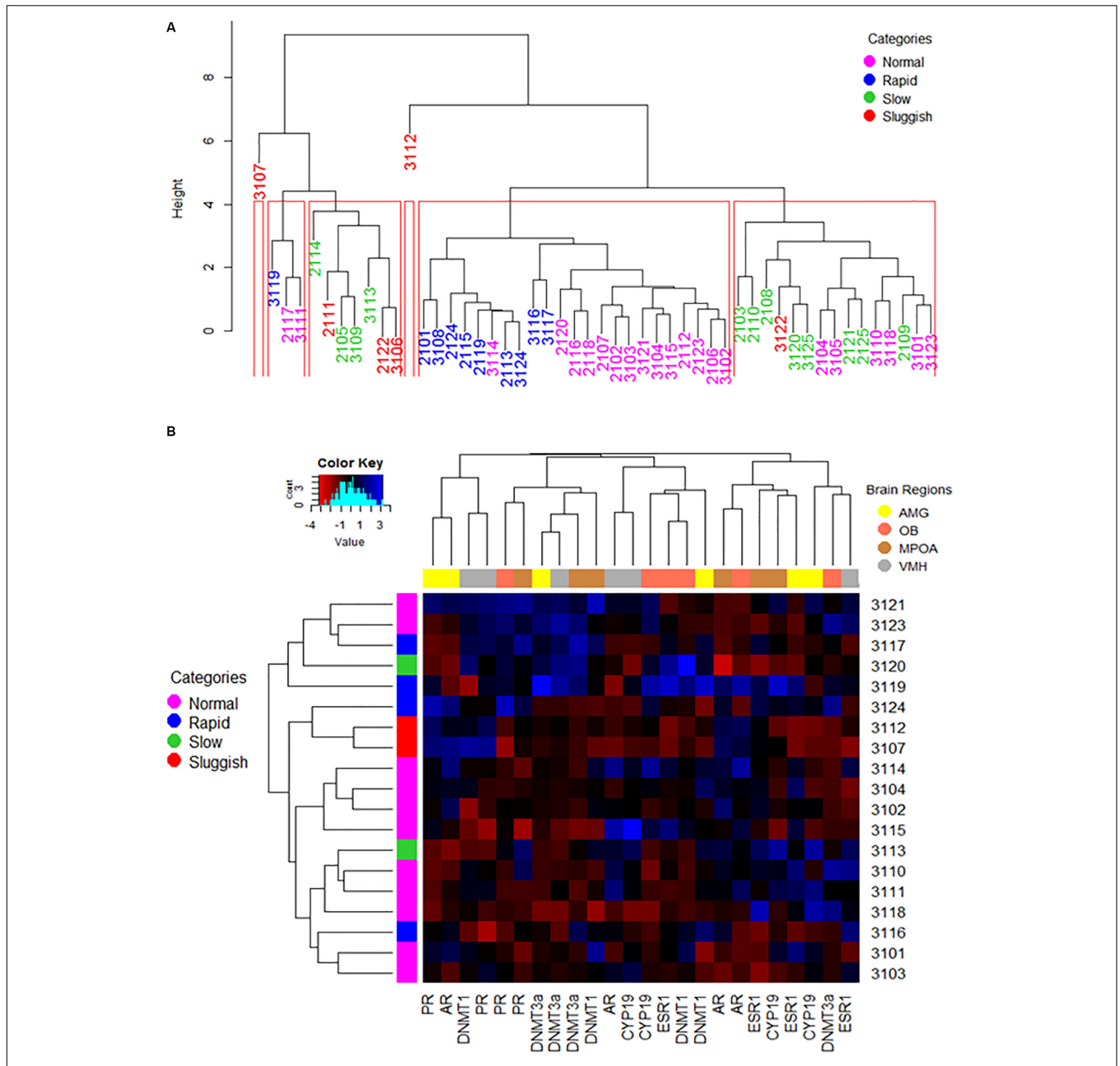
behavior across copulator males suggests that their individual phenotype arise from a common phenotypic plan.

### Relative Expression of Sexually Relevant Genes in Brain Limbic Areas Is Not Endophenotype Specific

As in previous studies (Pattij et al., 2005), in our own, male rats were first phenotyped and grouped using EL as the copulatory variable of phenotyping, after conducting six

copulatory encounters. Endophenotypes thus defined had nearly no overlap (**Figure 1A**). When male rats were phenotyped using EN as the copulatory variable of phenotyping, however, inter-endophenotype overlapping was much greater (**Supplementary Figure S4A**). Then, EL- or EN- endophenotypes seem more alike than different. So we evaluated the degree of similarity among phenotyped male rats including all the copulatory parameters through complete-linkage dendrograms. We found, again, that males presumably having different endophenotypes sparse across the clusters. We also contrasted the percentage of males from





**FIGURE 4 |** The way copulatory parameters and the expression of copulation relevant genes in pertinent brain limbic areas interact one another or altogether are not specific to either of the presumed EL-ejaculatory endophenotypes. **(A)** A complete linkage clustering dendrogram was used to estimate the degree of similarity among EL-phenotyped copulating males based on the way copulatory parameters interacted one another per phenotyped rat across the entire population of EL-phenotyped males ( $n = 50$ ). Notice that the population, including some sluggish copulating male rats, thresholds mixed down through the branching pattern of the dendrogram until reaching the tip of the tree where individual rapid, normal and sluggish copulating males show different degrees of phenotype similarity depending upon the final location within the tree, and likely the frequency of each “endophenotype” across the population. In red, we show the animal clusters obtained at the cut point of 4 in height. Such clusters were used to compare the consistency of the EL-ejaculatory endophenotypes. Overall, the way copulatory parameters interact one another in most of the copulating males are more alike than distinct regardless of EL-ejaculatory endophenotype each were assigned to. **(B)** The combined use of a heat map and of an agglomerative complete linkage clustering dendrogram allowed us to evaluate the degree of similarity among EL-phenotyped copulating males based on the way brain regional patterns and levels of gene expression interacted with one another per phenotyped rat across the entire population of EL-phenotyped males ( $n = 20$ ). In this figure, the heat map color-codes (blue the highest levels; see color key on the upper left corner) the relative levels of expression of AR, ESR1, CYP19, PR, DNMT1 and DNMT3a genes, clustered based upon the degree of similarity per limbic structure (see upper right corner for the color code assigned to each region in the dendrogram placed at the upper border of the heatmap) and per EL-phenotyped male (dendrogram placed at the left side of the heat map). Numerals on the right correspond the numeric code assigned to each of the EL-phenotyped male, also color-coded based upon the presumed endophenotype assigned (see upper right corner in **A**). Notice that gene expression clustering across the EL-phenotyped male population is ejaculatory endophenotype independent. The histogram on the upper left corner depicts the overall distribution of gene expression levels across the population of EL-phenotyped males. Amygdala: AMG; Olfactory bulb: OB; Medial preoptic area: MPOA; Ventromedial hypothalamus: VMH.

the same endophenotype that consistently clustered together. We clustered both EL- or EN-phenotyped male rats up to the Euclidean distance of 4 in height. This cut point left out of the analyses the two atypical values, while keeping the number of groups at endophenotypes comparable. In both cases, there were a total of six clusters. For EL- phenotyping only the fifth cluster (from left to right), represented 90% (9 of 10) of rapid males. However, the same cluster shared 64% (14 of 22) of normal males. For the case of EN-phenotyped males, the fifth cluster comprised 100% (6 of 6) of the VH male rats, 90% (9 of 10) of H males and 40% (8 of 20) of AV male rats. These results corroborate the inconsistency of the presumed EL- or EN- endophenotypes and of the covariates of phenotyping.

As the conventional perspective assumes that EL-endophenotypes arise from brains displaying phenotype-specific attributes (Olivier et al., 2006; Olivier and Olivier, 2019), we next tested whether the expression of *ESR1*, *PR*, *AR*, *CPY19*, *DNMT3a*, and *DNMT1* genes in the *AMG*, *OB*, *MPOA*, and *VMH* formed endophenotype specific clusters. In contrast to predictions, no endophenotype specific gene assemblages were observed as analyzed by complete-linkage, clustering dendrograms (**Figure 4A**). A similar result was observed after phenotyping males based on their EN (**Supplementary Figure S4A**).

We built also a clustering dendrogram aimed at evaluating whether EL- or EN-phenotyped males displayed endophenotype-specific assemblages of gene expression across limbic areas. Overall, we found four large gene clusters (**Figure 4B** and **Supplementary Figure S4B**). The first cluster grouped *AMG* and *VMH* having similar relative gene expression levels of *AR-PR* and *PR-DNMT1*, respectively, across the copulating male's population. The second cluster showed that all limbic areas analyzed had similar *PR* and *DNMTs* relative gene expression levels, across the copulating male's population. The third cluster showed that relative gene expression levels of *AR-CYP19* in *VMH*, *ESR1-CYP19* and *DNMT1* in *OB* and *AMG* were similar across copulating male's population. Lastly, the fourth cluster grouped *OB/MPOA* and *AMG/MPOA* having similar relative gene expression levels of *AR* and *ESR1-CYP19*, respectively, regardless of the copulatory endophenotype. Overall, no copulatory endophenotype specific gene expression clustering was observed across limbic structures.

## DISCUSSION

In man and in some other mammals, female and male hetero-, homo-, bi-, a-, hyper-, hypo-, trans- and other expressions of sexuality are thought to represent distinct phenotypes defined not only by their sexual behavioral display and sexual preference, but by brains having phenotype specific functional morphological attributes and genetic/epigenetic architectures (see introductory remarks). In following this tradition, it has been suggested that, at least in heterosexual copulating men and male rats, EL or ejaculation frequency (i.e., in this work ejaculation number; EN) represent each, endophenotypic traits that lie on the causal pathway between the genes, the brain and the disorders of

ejaculation (Pattij et al., 2005; Waldinger and Olivier, 2005; Olivier et al., 2006; Ventura-Aquino and Paredes, 2017). In addition, it is believed that ejaculatory endophenotypes are genetically imbedded and hence heritable and state independent (e.g., Pattij et al., 2005; see also introductory remarks). These claims, however, are challenged by past and recent evidence that supports that sexual behavior is highly variable and that the brain sexual functional morphology represents an intricate sexual phenotypic mosaic (see introductory remarks). Also, we have previously argued that the presumed ejaculatory endophenotypes are not so, but that they represent adaptive traits developed to affront ecological challenges (Lucio et al., 2012) and, as such, they might be mutable under precise state pressures (e.g., Rodríguez-Manzo and Canseco-Alba, 2014; Rodríguez-Peña et al., 2017; Canseco-Alba and Rodríguez-Manzo, 2019), regardless of whether these pressures are intrinsic or extrinsic to the organisms. Hence, for the ejaculatory endophenotypes to be considered a valid biological ground to understand normal or abnormal ejaculation within male populations, they must pass a validation test by assessing their internal consistency. A strategy to do this is to examine first whether the presumed endophenotypes retain or lose their identity when subjected to state pressures; by definition endophenotypes must be state independent (Flint and Munafò, 2007; Walters and Owen, 2007). Here, we approached the state-dependence property of the presumed ejaculatory endophenotypes by assessing first the effect of introducing as covariates of phenotyping *ML*, *IL*, *EN*, *MN*, or *IN* for EL-phenotyped copulating males or *EL*, *ML*, *IL*, *MN*, or *IN* for EN-phenotyped males, on endophenotype stability. Our results showed that including any other copulatory parameter, in addition to EL or EN, as phenotyping covariate, compromises the stability of the presumed EL- or EN-ejaculatory endophenotypes. A single attribute, or pairs of them, might not define fully an endophenotype though. Instead, it might be that summing up the effects of various traits could strengthen each endophenotype's consistency (Flint and Munafò, 2007; Walters and Owen, 2007). We then tested this possibility by evaluating the effects of introducing all of the copulatory parameters recorded as variables of phenotyping on the stability of the presumed EL- or EN-ejaculatory endophenotypes. The stability of the presumed EL- and EN- ejaculatory endophenotypes also failed at withstanding the test of state independence. Hence, at least at the behavioral level, our results support that the presumed EL- or EN-ejaculatory phenotypes lack intrinsic consistency since increasing the number of variables introduced in the analyses, greatly erodes their stability across the population of copulating males, the latter represented by the extensive overlapping of the copulating male rats assigned to either of the presumed EL- or EN-ejaculatory endophenotypes. In other words, the copulating males studied here display a mosaic-like copulatory behavioral pattern that may include attributes, in different degrees for each copulating male, assigned to any of presumed EL- or EN-ejaculatory endophenotypes. So, even though the concept sustaining the existence of male ejaculatory endophenotypes might useful in some clinical settings (see Walters and Owen, 2007 for considerations on this topic with regard to the use of the endophenotype concept in psychiatry), as things stand now,

its use might be misleading if sustained based only upon a single copulatory or ejaculatory parameter having no endophenotype specific gene architectures identified yet.

A fundamental assumption with regard to endophenotypes, is that their variation depends upon the additive effects of a reduced number of genes each contributing with a small effect to the endophenotype. Theoretically, the presumed genetic simplicity of endophenotypes would make them more genetically tractable in comparison to the complexity of the entire phenotype (see Walters and Owen, 2007 for a discussion on this topic), whether diseased or not. Another basic premise with regard to endophenotypes, at least from a psychiatric stand, is that they should have reliable and valid psychometric and neurometric properties and be sufficiently sensitive to pinpoint individual differences (also see Walters and Owen, 2007 for thoughtful considerations on the matter). Based on these premises, because copulatory behavior arises from the conjoint work of various brain centers, we thought important to evaluate the internal consistency of the presumed EL- and EN-ejaculatory endophenotypes by looking at the patterns and levels of expression of a handful of copulation relevant genes in a few copulation relevant brain limbic areas. Purposely, we assessed whether these parameters were specific to any of the presumed EL- or EN-ejaculatory endophenotypes. In contrast to predictions, we found *ESR1*, *PR*, *AR*, *CPY19*, *DNMT3a*, and *DNMT1* gene expression across the *AMG*, *OB*, *MPOA*, and *VMH* to be uncorrelated with any of the presumed EL- or EN-ejaculatory endophenotypes. Gene expression patterns and levels overlapped across the population of EL- or EN-phenotyped copulating males. Hence, together, the behavioral and molecular data gathered here show that presumed EL- or EN-ejaculatory endophenotypes have no intrinsic consistency. Instead, it appears that animals presumed to display distinct ejaculatory endophenotypes in fact represent variations of a common copulatory phenotype. In support to this conclusion, notice that most of the EL- or EN-phenotyped copulating males cluster within the same area of the PCA-biplot. Hence, even though we found that there were group-level differences in all the variables that were studied, these differences did not add-up to create the presumed, EL- or EN-ejaculatory endophenotypes.

Attributing significant variations of phenotypic traits to gene mutations has become a customary, problem-solving strategy in biological/biomedical sciences. The endophenotype's notion is at the core of this trend (Gottesman and Gould, 2003; Burmeister et al., 2008; Garcia et al., 2010; Iacono et al., 2014; Zietsch et al., 2015). Sizeable phenotypic variations, nonetheless, may also emerge through epigenetic mechanisms (Ayala-García et al., 2013; see also comments on the effects of epigenetics on endophenotype expression in Hasler et al., 2006). That this might be the case for the copulator male rats included in our sample is supported by data showing that relative gene expression levels of *DNMT-1* and *DNMT-3a* differ greatly across individuals; these enzymes are involved in the transferring of methyl groups to DNA and thus in the epigenetic regulation of gene expression. Also, the lack of internal consistency of the presumed EL- or EN-ejaculatory endophenotypes, the degree of interindividual variation observed among copulating male rats assigned to any of the presumed EL- or EN-ejaculatory

endophenotypes, and the high degree of similarity across the EL- or EN-phenotyped copulating male rats, also pinpoint to epigenetic processes as the likely source of variation. Nugent et al. (2015, 2017) have in fact demonstrated that adult male sexual behavior in male mice and rats requires several genes to be de-methylated in neurons of the developing preoptic area (see also Mosley et al., 2017). Although the epigenetic factor involved in generating these inter-individual variations is unclear, a good candidate worth exploring is the mother-litter, differential care. Indeed, it has been shown that genital licking by the mother early during postnatal development influences copulatory behavior in adulthood; the lengthier the licking, the better the display of adult copulatory behavior (Lenz and Sengelaub, 2006, 2009, 2010). The merits of this idea must be addressed in future experiments.

To end the discussion section of this work, we would like to make three additional considerations and a final cautionary note. First, why would it be best for any species interests to have a no endophenotype-mediated relationship between brain and behavior with regard to sex? A recent study suggests that keeping phenotype, sexually dimorphic features may have negative effects for the species survival (Martins et al., 2018). Second, it has been suggested that males have the ability to adjust the quality of the ejaculation based upon the risk of or the actual sexual competition (Parker and Pizzari, 2010). Models predict that males adjust following the same rules based on the presumption that they have similar copulatory abilities and therefore strategies to solve the conflict (Parker, 1998). The fact that copulatory behavior seems not to be endophenotypic, but highly diverse, suggests that assumptions of these models may be incorrect. Third, neuro-pharmacologists dealing with "sexual dysfunctions" used the concept of ejaculatory endophenotypes (Olivier et al., 2006) to dictate guidelines to develop pharmacological agents to treat these conditions. Since the presumed ejaculatory endophenotypes seem to lack intrinsic consistency, their use as a conceptual frame to design pharmacological agents must be taken with reserve. Finally, it is worth recognizing that the present work has limitations that restrict, to some degree, the breath of its conclusions. Future studies must then explore (1) the heritability of the presumed EL- or EN-ejaculatory endophenotypes, (2) other behavioral, genetic and neurophysiological traits with the potential of being endophenotypic characters, (3) expression of other copulation/ejaculation relevant genes in a greater number of brain areas, and (4) the effects of increasing further sample size to more thoroughly evaluate the existence of male ejaculatory endophenotypes. In spite of our work limitations, nonetheless, the fact that sexual training (i.e., increasing the extrinsic state pressures) lengthens ejaculation latency in copulating male rats displaying short ejaculation latencies (Rodríguez-Peña et al., 2017) supports that ejaculatory latency is not an endophenotypic trait since it is not state independent. Finally, even if ejaculation latency would satisfy the criteria to be considered an endophenotypic trait, this would not exclude the possibility that it is an epiphenomenon with respect to the condition such endophenotype trait is presumed to represent (Walters and Owen, 2007).

Overall, our results provide cautionary information on the utility of the notion of endophenotypes to study male copulatory behavior in copulating heterosexual subjects. The diversity of male copulatory behavior observed in male rats here is in line with current ideas suggesting that sexuality is better perceived as a non-linear, behavioral manifestation that arises from combinatorial, multi-morphic mosaics of brain molecular architectures and functional morphological arrangements. Under this context, direct predictions about how sexual behavior will be manifested based on brain organizational features are condemned to serious flaws.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated for this study can be found in the Universal Probe Library Roche. Dataset of male rat copulatory behavior. doi: 10.6084/m9.figshare.12108984.v2. <https://github.com/ItztliSanchez/Trejo-Sanchez-2020>.

## ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by the Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales del Laboratorio, IIB, UNAM (Permit No. 163).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

IT-S and GG-O designed the research and wrote the manuscript. IT-S and CP-M performed the experiments and analyzed the data. SH-P supervised the statistical analyses and helped for writing the statistical analyses section. All authors contributed to the manuscript revision, read and approved the submitted version.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Jesús Ramírez Santos (IIB, UNAM), Dra. Margarita Gómez Chavarín (Facultad de Medicina, UNAM) and Marie Bedos (Instituto de Neurobiología, UNAM) for technical support. We are also indebted to Dra. Diana Donaji del Callejo Canal (Instituto de Investigación de Estudios Superiores, Económicos y Sociales, Universidad Veracruzana) and Dr. Gustavo Cruz-Cárdenas (Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Michoacán, Instituto Politécnico Nacional) who served as unbiased statistician-reviewers. Itztli Graciela Trejo Sánchez was a doctoral student from Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship No. 345024 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Mexico.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnbeh.2020.00090/full#supplementary-material>

**FIGURE S1** | Distribution of copulating male rats before phenotyping, relative to different copulatory parameters. Histogram plots constructed based upon the probability density that depict the distribution of copulator males ( $n = 50$ ), when classified based upon (A) ejaculation latency, (B) cumulative ejaculation number, (C) mount latency, (D) cumulative mount number, (E) intromission latency, and (F) cumulative intromission number. Even though ejaculation and intromission latency curves are slightly right-hand skewed, for the most part, our copulating male sample distributes normally relative to each of the copulatory parameters. So, we can safely say that we begin our study with an unimodal population of copulating male rats.

**FIGURE S2** | The internal consistency of the presumed EN-ejaculatory endophenotypes is compromised by introducing any other copulatory parameter in addition to EN as phenotyping variate. Boxplots and probability density plots allowed us to evaluate the internal consistency of the presumed EN-ejaculatory endophenotypes (B) after introducing as covariates of phenotyping ejaculation latency (A), mount latency (C), intromission latency (E), cumulative mount number (D), and cumulative intromission number (F). When EN was used as the exclusive phenotyping variate, a fair segregation with virtually relatively little overlapping among the presumed EN-ejaculatory endophenotypes was observed (B). In contrast, when EN was paired with mount latency (C), intromission latency (E), cumulative mount number (D), and cumulative intromission number (F), a great deal of overlapping occurred among the presumed EN-ejaculatory endophenotypes. Something similar happened when EN was paired with ejaculation latency (A) with the exception of the sluggish copulating males who stayed a bit segregated from the rest of the presumed EN-ejaculatory endophenotypes.

**FIGURE S3** | The internal consistency of the presumed EN-ejaculatory endophenotypes is compromised by introducing the entire set of copulatory parameters to phenotype copulating males. Principal component analyses (PCA) biplot that allowed us to evaluate the internal consistency of the presumed EN-ejaculatory endophenotypes after introducing all copulatory parameters as covariates of phenotyping. Notice that the way copulatory parameters interact one another per copulating male rat tends to be similar regardless of the EN-ejaculatory phenotype each were assigned to. This circumstance leads to a distribution characterized by a strong overlapping of copulating male rats assigned to either of the presumed EN-ejaculatory endophenotypes; most of them share the same space in the graph (grey circle). The exception being a handful of sluggish copulating males. However, the phenotypic variation among them is so high, that envisioning them as representing true endophenotypes is untenable; they might be better seen as outliers. Also notice that 82.1% of the population variance was explained by PC1 and PC2. Copulating male rats assigned to the EN-ejaculatory phenotypes are numbered and color-coded differentially; the color-key is placed at the right side of the PCA biplot. Copulating male rats assigned to the same ejaculatory endophenotype are enclosed by elliptical traces of the same color; the greater the ellipse area, the highest the estimated intra-categorical variability. Vectors represent copulatory parameters; the closer the angle between vectors, the higher their correlation. Complementary information on PCA is showed in **Supplementary Figure S5**. PC1: Principal component one; PC2: Principal component two. EL, ejaculation latency; EN, cumulative ejaculation number; IL, intromission latency; IN, cumulative intromission number; ML, mount latency; MN, cumulative mount number.

**FIGURE S4** | The way copulatory parameters and the expression of copulation relevant genes in pertinent brain limbic areas interacts one another or altogether are not specific to either of the presumed EN-ejaculatory endophenotypes. (A) A complete linkage clustering dendrogram was used to estimate the degree of similarity among EN-phenotyped copulating males based on the way copulatory parameters interacted one another per phenotyped rat across the entire population of EN-phenotyped males ( $n = 50$ ). Notice that the population including some very low copulating male rats, threses mixed down through the branching

pattern of the dendrogram until reaching the tip of the tree where individual VH, H, AV, L and VL copulating males show different degrees of phenotype similarity depending upon the final location within the tree, and likely the frequency of each endophenotype across the population. In red, we show the animal clusters obtained at the cut point of 4 in height. Such clusters were used to compare the consistency of the EN-ejaculatory endophenotypes. Overall, the way copulatory parameters interact one another in most of the copulating males are more alike than distinct regardless of EN-ejaculatory endophenotype each was assigned to. **(B)** The combined use of a heat map and of a complete linkage dendrogram allowed us to evaluate the degree of similarity among EN-phenotyped copulating males, based on the way brain regional patterns and levels of gene expression interacted with one another per phenotyped rat across the entire population of EN-phenotyped males ( $n = 20$ ). In this figure, the heat map color-codes (blue the highest levels; see color key on the upper left corner) the relative levels of expression of AR, ESR1, CYP19, PR, DNMT1, and DNMT3a genes, clustered based upon the degree of similarity per limbic structure (see upper right corner for the color code assigned to each region in the dendrogram placed at the upper border of the heatmap) and per EN-phenotyped male (dendrogram placed at the left side of the heat map). Numerals on the right correspond to the numeric code assigned to each of the EN-phenotyped male, also color-coded based upon the endophenotype assigned [see upper right corner in panel **(A)**]. Notice that gene expression clustering across the EN-phenotyped male population is ejaculatory endophenotype independent. The histogram on the upper left corner depicts the overall distribution of gene expression levels across the population of

EN-phenotyped males. Amygdala: AMG; Olfactory bulb: OB; Medial preoptic area: MPOA; Ventromedial hypothalamus: VMH.

**FIGURE S5 |** Principal component analyses criteria of design. In our study, we assessed the internal consistency of the presumed ejaculatory endophenotypes by evaluating the distribution of copulating male rats after introducing the way all copulatory parameters interact one another per phenotyped animal, through a principal component analysis (PCA). After evaluating the percentage of variance retained by each principal component **(A)**, we decided to run a two-dimensional analysis because components 1 and 2 explained up to 82.1% of the sample's variance. This decision was proved to be correct since the values of the square cosine ( $\text{Cos}^2$ ) for each of the copulatory variables considered in the analysis were all above 0.5 **(B)**, so they all are adequately represented in the sample examined through the two dimensional analysis. Finally, the percentage of contribution of every variable per component was estimated **(C,D)**. The red dashed line in C and D indicates the expected average contribution (16.7%). Having this reference in mind, it becomes clear that mount (ML) and intromission (IL) latencies together with mount (MN) and intromission (MN) cumulative numbers explain most of the sample variance associated to component number one **(C)** and that ejaculation number (EN) and latency (EL) together with mount (MN) and intromission (IN) numbers mainly explain the variance associated to component number two **(D)**. EL, ejaculation latency; EN, cumulative ejaculation number; IL, intromission latency; IN, cumulative intromission number; ML, mount latency; MN, cumulative mount number.

## REFERENCES

- Abdel-Hamid, I. A., and Ali, O. I. (2018). Delayed ejaculation: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *World J. Mens Health* 36, 22–40. doi: 10.5534/wjmh.17051
- Absher, J. Y. (2016). “Hypersexuality and neuroimaging personality, social cognition, and character,” in *Neuroimaging Personality, Social Cognition and Character*, eds J. Y. Absher and J. Cloutier (Cambridge, MA: Academic Press), 3–22. doi: 10.1016/b978-0-12-800935-2.00001-4
- Alexander, B. M., Perkins, A., Van Kirk, E. A., Moss, G. E., and Fitzgerald, J. A. (1993). Hypothalamic and hypophyseal receptors for estradiol in high and low sexually performing rams. *Horm. Behav.* 27, 296–307. doi: 10.1006/hbeh.1993.1022
- Alexander, B. M., Stellflug, J. N., Rose, J. D., Fitzgerald, J. A., and Moss, G. E. (1999). Behavior and endocrine changes in high-performing, low-performing, and male-oriented domestic rams following exposure to rams and ewes in estrus when copulation is precluded. *J. Anim. Sci.* 77, 1869–1874. doi: 10.2527/1999.7771869x
- Amezua-Gutiérrez, C., Hernández-González, M., Fernández Guasti, A., Cruz Aguilar, M. A., and Guevara, M. A. (2018). Observing erotic videos with heterosexual content induces different cerebral response in homosexual and heterosexual men. *J. Homosex.* 67, 639–657. doi: 10.1080/00918369.2018.1550331
- Antaramian, A., González-Gallardo, A., García-Ugalde, C., Portillo, W., and Paredes, R. G. (2015). Steroid receptors and aromatase gene expression in different brain areas of copulating and sexually sluggish male rats. *J. Sex. Med.* 12, 2267–2275. doi: 10.1111/jsm.13073
- Arnold, A. P. (2017). A general theory of sexual differentiation. *J. Neurosci. Res.* 95, 291–300. doi: 10.1002/jnr.23884
- Arnold, A. P., and Chen, X. (2009). What does the “four core genotypes” mouse model tell us about sex differences in the brain and other tissues? *Front. Neuroendocrinol.* 30:1. doi: 10.1016/j.yfrne.2008.11.001
- Ayala-García, B., Ayala-García, B., Lopez-Santibanez Guevara, M., Lopez-Santibanez Guevara, M., Marcos-Camacho, L. I., Marcos-Camacho, L. I., et al. (2013). Speciation, phenotypic variation and plasticity: what can endocrine disruptors tell us? *Int. J. Endocrinol.* 2013:862739. doi: 10.1155/2013/862739
- Balthazart, J. (2016). Sex differences in partner preferences in humans and animals. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 371:20150118. doi: 10.1098/rstb.2015.0118
- Berglund, H., Lindström, P., and Savic, I. (2006). Brain response to putative pheromones in lesbian women. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 8269–8274. doi: 10.1073/pnas.0600331103
- Borja, F., and Fabre-Nys, C. (2012). Brain structures involved in the sexual behaviour of Ile de France rams with different sexual preferences and levels of sexual activity. *Behav. Brain Res.* 226, 411–419. doi: 10.1016/j.bbr.2011.09.037
- Burke, S. M., Manzouri, A. H., and Savic, I. (2017). Structural connections in the brain in relation to gender identity and sexual orientation. *Sci. Rep.* 7:17954. doi: 10.1038/s41598-017-17352-8
- Burmeister, M., McInnis, M. G., and Zöllner, S. (2008). Psychiatric genetics: progress amid controversy. *Nat. Rev. Genet.* 9, 527–540. doi: 10.1038/nrg2381
- Canseco-Alba, A., and Rodríguez-Manzo, G. (2019). Sexual interaction is essential for the transformation of non-copulating rats into sexually active animals by the endocannabinoid anandamide. *Behav. Brain Res.* 359, 418–427. doi: 10.1016/j.bbr.2018.11.015
- Cerny, J. A., and Janssen, E. (2011). Patterns of sexual arousal in homosexual, bisexual, and heterosexual men. *Arch. Sex. Behav.* 40, 687–697. doi: 10.1007/s10508-011-9746-0
- Chen, J. (2016). The pathophysiology of delayed ejaculation. *Transl. Androl. Urol.* 5, 549–562. doi: 10.21037/tau.2016.05.03
- Chivers, M. L., Rieger, G., Latty, E., and Bailey, J. M. (2004). A sex difference in the specificity of sexual arousal. *Psychol. Sci.* 15, 736–744. doi: 10.1111/j.0956-7976.2004.00750.x
- Coria-Avila, G. A. (2012). The role of conditioning on heterosexual and homosexual partner preferences in rats. *Socioaffect. Neurosci. Psychol.* 2:17340. doi: 10.3402/snp.v2i0.17340
- Coria-Avila, G. A., Herrera-Covarrubias, D., Paredes-Ramos, P., Alvarez-Croda, D. M., Tecamachaltzi-Silvarán, M. B., Rosales-Raya, J. B., et al. (2014). Brain dimorphism and sexual partner preference in a pseudohermaphrodite rat. *Rev. Neurobiol.* 5:090614.
- Crews, D. (2012). The (bi)sexual brain. science & society series on sex and science. *EMBO Rep.* 13, 779–784. doi: 10.1038/embor.2012.107
- Damassa, D. A., Smith, E. R., Tennent, B., and Davidson, J. M. (1977). The relationship between circulating testosterone levels and male sexual behavior in rats. *Horm. Behav.* 8, 275–286. doi: 10.1016/0018-506x(77)9002-2
- de Vries, G. J., and Södersten, P. (2009). Sex differences in the brain: the relationship between structure and function. *Horm. Behav.* 55, 589–596. doi: 10.1016/j.yhbeh.2009.03.012
- Diamond, L. M. (2016). Sexual fluidity in male and females. *Curr. Sex. Health Rep.* 8, 249–256. doi: 10.1007/s11930-016-0092-z
- Diamond, L. M., Dickenson, J. A., and Blair, K. L. (2017). Stability of sexual attractions across different timescales: the roles of bisexuality and gender. *Arch. Sex. Behav.* 46, 193–204. doi: 10.1007/s10508-016-0860-x

- Epstein, R., McKinney, P., Fox, S., and García, C. (2012). Support for a fluid-continuum model of sexual orientation: a large-scale internet study. *J. Homosex.* 59, 1356–1381. doi: 10.1080/00918369.2012.724634
- Fernández-Guasti, A., Kruijver, F. P. M., Fodor, M., and Swaab, D. F. (2000). Sex differences in the distribution of androgen receptors in the human hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 425, 422–435. doi: 10.1002/1096-9861(20000925)425:3<422::aid-cne7>3.0.co;2-h
- Flanagan-Cato, L. M. (2011). Sex differences in the neural circuit that mediates sexual receptivity. *Front. Neuroendocrinol.* 32, 124–136. doi: 10.1016/j.yfrne.2011.02.008
- Flint, J., and Munafò, M. R. (2007). The endophenotype concept in psychiatric genetics. *Psychol. Med.* 37, 163–180. doi: 10.1017/S0033291706008750
- Forger, N. G. (2016). Epigenetic mechanisms in sexual differentiation of the brain and behaviour. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 371:20150114. doi: 10.1098/rstb.2015.0114
- Ganna, A., Verweij, K. J. H., Nivard, M. G., Maier, R., Wedow, R., Busch, A. S., et al. (2019). Large-scale GWAS reveals insights into the genetic architecture of same-sex sexual behavior. *Science* 365:eaat7693. doi: 10.1126/science.aat7693
- García, J. R., Aller, E. L., Lum, J. K., Wilson, D. S., Merriwether, A. M., and Mackillop, J. (2010). Associations between dopamine d4 receptor gene variation with both infidelity and sexual promiscuity. *PLoS One* 5:e14162. doi: 10.1371/journal.pone.0014162
- García-Falgueras, A., and Swaab, D. F. (2008). A sex difference in the hypothalamic uncinate nucleus: relationship to gender identity. *Brain* 131, 3132–3146. doi: 10.1093/brain/awn276
- Gottesman, I. I., and Gould, T. D. (2003). The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *Am. J. Psychiatry* 160, 636–645. doi: 10.1176/appi.ajp.160.4.636
- Hasler, G., Drevets, W. C., Gould, T. D., Gottesman, I. I., and Manji, H. K. (2006). Toward constructing an endophenotype strategy for bipolar disorders. *Biol. Psychiatry* 60, 93–105. doi: 10.1016/j.biopsych.2005.11.006
- Hines, M. (2010). Sex-related variation in human behavior and the brain. *Trends Cogn. Sci.* 14, 448–456. doi: 10.1016/j.tics.2010.07.005
- Holstege, G., Georgiadis, J. R., Paans, A. M., Meiners, L. C., Van der Graaf, F. H., and Reinders, A. A. (2003). Brain activation during human male ejaculation. *J. Neurosci.* 23, 9185–9193. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-27-09185.2003
- Ho-Shing, O., and Dulac, C. (2019). Influences of genomic imprinting on brain function and behavior. *Curr. Opin. Behav. Sci.* 25, 66–76. doi: 10.1016/j.cobeha.2018.08.008
- Hull, E. M., and Dominguez, J. M. (2007). Sexual behavior in male rodents. *Horm. Behav.* 52, 45–55. doi: 10.1016/j.yhbeh.2007.03.030
- Hull, E. M., and Rodríguez-Manzo, G. (2009). “Male sexual behavior,” in *Hormones, Brain and Behavior*, 2nd Edn, Vol. 1, eds D. W. Pfaff, A. P. Arnold, A. M. Etgen, S. E. Fahrbach, and R. T. Rubin (San Diego, CA: Academic Press), 5–65.
- Hyde, J. S., Bigler, R. S., Joel, D., Tate, C. C., and Van Anders, S. M. (2019). The future of sex and gender in psychology: five challenges to the gender binary. *Am. Psychol.* 74, 171–193. doi: 10.1037/amp0000307
- Hyun, J. S., Kam, S. C., and Kwon, O. Y. (2008). Changes of cerebral current source by audiovisual erotic stimuli in premature ejaculation patients. *J. Sex Med.* 5, 1474–1481. doi: 10.1111/j.1743-6109.2007.00734.x
- Iacono, W. G., Malone, S. M., Vaidyanathan, U., and Vrieze, S. I. (2014). Genome-wide scans of genetic variants for psychophysiological endophenotypes: a methodological overview. *Psychophysiology* 51, 1207–1224. doi: 10.1111/psyp.12343
- Jazin, E., and Cahill, L. (2010). Sex differences in molecular neuroscience: from fruit flies to humans. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 9–17. doi: 10.1038/nrn2754
- Joel, D. (2011). Male or female? Brains are intersex. *Front. Integr. Neurosci.* 5:57. doi: 10.3389/fnint.2011.00057
- Joel, D. (2012). Genetic-gonadal-genital sex (3G-sex) and the misconception of brain and gender, or, why 3G-males and 3G-females have intersex brain and intersex gender. *Biol. Sex Differ.* 3:27. doi: 10.1186/2042-6410-3-27
- Joel, D., Berman, Z., Tavor, I., Wexler, N., Gaber, O., Stein, Y., et al. (2015). Sex beyond the genitalia: the human brain mosaic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 15468–15473. doi: 10.1073/pnas.1509654112
- Joel, D., and Fausto-Sterling, A. (2016). Beyond sex differences: new approaches for thinking about variation in brain structure and function. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 371:20150451. doi: 10.1098/rstb.2015.0451
- Joel, D., and Yankelevitch-Yahav, R. (2014). Reconceptualizing sex, brain and psychopathology: interaction, interaction, interaction. *Br. J. Pharmacol.* 171, 4620–4635. doi: 10.1111/bph.12732
- Jonas, K. G., and Markon, K. E. (2014). A meta-analytic evaluation of the endophenotype hypothesis: effects of measurement paradigm in the psychiatric genetics of impulsivity. *J. Abnorm. Psychol.* 123, 660–675. doi: 10.1037/a0037094
- Jordan, K. (2010). “The brain between sex and gender,” in *Sex and Gender in Biomedicine*, eds I. Klinge and C. Wieseman (Göttingen: Universitätsverlag Göttingen), 79–99.
- Keverne, E. B. (2013). Importance of the matriline for genomic imprinting, brain, development and behaviour. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 368:20110327. doi: 10.1098/rstb.2011.0327
- Kruijver, F. P. M., Zhou, J. N., Pool, C. W., Hofman, M. A., Gooren, J. G., and Swaab, D. F. (2000). Male-to-female transsexuals have female neuron numbers in the limbic nucleus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 2034–2041. doi: 10.1210/jcem.85.5.6564
- LaClair, M., Febo, M., Nephew, B., Gervais, N. J., Poirier, G., Workman, K., et al. (2019). Sex differences in cognitive flexibility and resting brain networks in middle-aged marmosets. *eNeuro* 6:ENEURO.0154-19.2019. doi: 10.1523/ENEURO.0154-19.2019
- Lenz, K. M., and Sengelaub, D. R. (2006). Maternal licking influences dendritic development of motoneurons in a sexually dimorphic neuromuscular system. *Brain Res.* 1092, 87–99. doi: 10.1016/j.brainres.2006.03.070
- Lenz, K. M., and Sengelaub, D. R. (2009). Maternal care effects on SNB motoneuron development: the mediating role of sensory afferent distribution and activity. *Dev. Neurobiol.* 69, 603–615. doi: 10.1002/dneu.20729
- Lenz, K. M., and Sengelaub, D. R. (2010). Maternal care effects on the development of a sexually dimorphic motor system: the role of spinal oxytocin. *Horm. Behav.* 58, 575–581. doi: 10.1016/j.yhbeh.2010.07.010
- Lucio, R. A., Cruz, Y., Pichardo, A. I., Fuentes-Morales, M. R., Fuentes-Farías, A. L., Molina-Céron, M. L., et al. (2012). The physiology and ecophysiology of ejaculation. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 15, S113–S127.
- Luoto, S., Krams, I., and Rantala, M. J. (2019). A life history approach to the female sexual orientation spectrum: evolution, development, causal mechanisms, and health. *Arch. Sex Behav.* 48, 1273–1308. doi: 10.1007/s10508-018-1261-0
- Martins, M. J. F., Puckett, T. M., Lockwood, R., Swaddle, J. P., and Hunt, G. (2018). High male sexual investment as a driver of extinction in fossil ostracods. *Nature* 556, 366–369. doi: 10.1038/s41586-018-0020-7
- McCarthy, M. M. (2019). Is sexual differentiation of brain and behavior epigenetic? *Curr. Opin. Behav. Sci.* 25, 83–88. doi: 10.1016/j.cobeha.2018.10.005
- McCarthy, M. M., Herold, K., and Stockman, S. L. (2018). Fast, furious and enduring: sensitive versus critical periods in sexual differentiation of the brain. *Physiol. Behav.* 187, 13–19. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.10.030
- McCarthy, M. M., and Nugent, B. M. (2015). At the frontier of epigenetics of brain sex differences. *Front. Behav. Neurosci.* 9:221. doi: 10.3389/fnbeh.2015.00221
- Morgentaler, A., Polzer, P., Althof, S., Bolyakov, A., Donatucci, C., Ni, X., et al. (2017). Delayed ejaculation and associated complaints: relationship to ejaculation times and serum testosterone levels. *J. Sex Med.* 14, 1116–1124. doi: 10.1016/j.jsxm.2017.06.013
- Mosley, M., Weathington, J., Cortes, L. R., Bruggeman, E., Castillo-Ruiz, A., Xue, B., et al. (2017). Neonatal inhibition of DNA methylation alters cell phenotype in sexually dimorphic regions of the mouse brain. *Endocrinology* 158, 1838–1848. doi: 10.1210/en.2017-00205
- Ngun, T. C., Ghahramani, N., Sánchez, F. J., Bocklandt, S., and Vilain, E. (2011). The genetics of sex differences in brain and behavior. *Front. Neuroendocrinol.* 32, 227–246. doi: 10.1016/j.yfrne.2010.10.001
- Nugent, B. M., Wright, C. L., Shetty, A. C., Hodes, G. E., Lenz, K. M., Mahurkar, A., et al. (2015). Brain feminization requires active repression of masculinization via DNA methylation. *Nat. Neurosci.* 18, 690–697. doi: 10.1038/nn.3988
- Nugent, B. M., Wright, C. L., Shetty, A. C., Hodes, G. E., Lenz, K. M., Mahurkar, A., et al. (2017). Corrigendum: brain feminization requires active repression of masculinization via DNA methylation. *Nat. Neurosci.* 20:896. doi: 10.1038/nn0617-896a
- Olivier, B., Chan, J. S. W., Pattij, T., de Jong, T. R., Oosting, R. S., Veening, J. G., et al. (2006). Psychopharmacology of male rat sexual behavior: modeling human sexual dysfunctions? *Int. J. Impot. Res.* 18, S14–S23. doi: 10.1038/sj.ijir.3901330

- Olivier, J. D. A., and Olivier, B. (2019). Antidepressants and sexual dysfunctions: a translational perspective. *Curr. Sex. Health Rep.* 11, 156–166. doi: 10.1007/s11930-019-00205-y
- Olvera-Hernández, S., and Fernández-Guasti, A. (2015). Central and peripheral effects of the prenatal letrozole administration in male rats: is it a good model to study human male homosexuality? *Rev. Mex. Endocrinol. Metab. Nutr.* 2, 68–79.
- Ozcan, C., Ozbek, E., Soylyu, A., Yilmaz, U., Guzelipek, M., and Balbay, M. D. (2001). Auditory event-related potentials in patients with premature ejaculation. *Urology* 58, 1025–1029. doi: 10.1016/s0090-4295(01)01428-5
- Parker, G. A. (1998). “Sperm competition and the evolution of ejaculates: towards a theory base,” in *Sperm Competition and Sexual Selection*, eds T. R. Birkhead and A. P. Møller (London: Academic Press), 3–54. doi: 10.1016/b978-012100543-6/50026-x
- Parker, G. A., and Pizzari, T. (2010). Sperm competition and ejaculate economics. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 85, 897–934. doi: 10.1111/j.1469-185X.2010.00140.x
- Pattij, T., De Jong, T. R., Uitterdijk, A., Waldinger, M. D., Veening, J. G., Cools, A. R., et al. (2005). Individual differences in male rat ejaculatory behaviour: searching for models to study ejaculation disorders. *Eur. J. Neurosci.* 22, 724–734. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04252.x
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29:e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45
- Ponseti, J., Bosinski, H. A., Wolff, S., Peller, M., Jansen, O., Mehdorn, H. M., et al. (2006). A functional endophenotype for sexual orientation in humans. *Neuroimage* 33, 825–833. doi: 10.1016/j.neuroimage.2006.08.002
- Portillo, W., Camacho, F., Eguibar, J. R., and Paredes, R. G. (2010). Behavioral characterization of non-copulating male rats with high spontaneous yawning frequency rate. *Behav. Brain Res.* 214, 225–230. doi: 10.1016/j.bbr.2010.05.028
- Portillo, W., Díaz, N. F., Cabrera, E. A., Fernández-Guasti, A., and Paredes, R. G. (2006a). Comparative analysis of immunoreactive cells for androgen receptors and oestrogen receptor  $\alpha$  in copulating and non-copulating male rats. *J. Neuroendocrinol.* 18, 168–176. doi: 10.1111/j.1365-2826.2005.01401.x
- Portillo, W., Díaz, N. F., Retana-Márquez, S., and Paredes, R. G. (2006b). Olfactory, partner preference and Fos expression in the vomeronasal projection pathway of sexually sluggish male rats. *Physiol. Behav.* 88, 389–397. doi: 10.1016/j.physbeh.2006.04.023
- Portillo, W., and Paredes, R. G. (2003). Sexual and olfactory preference in noncopulating male rats. *Physiol. Behav.* 80, 155–162. doi: 10.1016/s0031-9384(03)00231-2
- Portillo, W., and Paredes, R. G. (2019). Motivational drive in non-copulating and socially monogamous mammals. *Front. Behav. Neurosci.* 13:238. doi: 10.3389/fnbeh.2019.00238
- Prause, N., and Harenski, C. (2014). “Inhibition, lack of excitation, or suppression: fMRI pilot of asexuality,” in *Asexualities Feminist and Queer Perspectives*, eds K. J. Ceranowski and M. Milks (New York, NY: Routledge Taylor and Francis Group), 35–54. doi: 10.4324/9781315882673
- R Core Team (2020). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Available online at: <https://www.R-project.org>
- Rahman, Q. (2005). The neurodevelopment of human sexual orientation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 1057–1066. doi: 10.1016/j.neubiorev.2005.03.002
- Rahman, Q., and Yusuf, S. (2015). Lateralization for processing facial emotions in gay men, heterosexual men and heretosexual women. *Arch. Sex Behav.* 44, 1405–1413. doi: 10.1007/s10508-014-0466-0
- Rice, W. R., Friberg, U., and Gavrilits, S. (2013). Homosexuality via canalized sexual development: a testing protocol for a new epigenetic model. *Bioessays* 35, 764–770. doi: 10.1002/bies.201300033
- Rodríguez-Manzo, G., and Canseco-Alba, A. (2014). “A role for learning and memory in the expression of an innate behavior: the case of copulatory behavior,” in *Identification of Neural Markers Accompanying Memory*, ed. A. Menses (Amsterdam: Elsevier), 135–147. doi: 10.1016/b978-0-12-408139-0.00009-2
- Rodríguez-Peña, M. L., Rodríguez-Manzo, G., and Carro-Juárez, M. (2017). Ejaculatory training lengthens the ejaculation latency and facilitates the functioning of the spinal generator for ejaculation of rats with rapid ejaculation. *Int. J. Impot. Res.* 29, 35–42. doi: 10.1038/ijir.2016.42
- Rosenthal, A. M., Sylva, D., Safron, A., and Bailey, J. M. (2011). Sexual arousal patterns of bisexual men revisited. *Biol. Psychol.* 88, 112–115. doi: 10.1016/j.biopsycho.2011.06.015
- Rosenthal, A. M., Sylva, D., Safron, A., and Bailey, J. M. (2012). The male bisexuality debate revisited: some bisexual men have bisexual arousal patterns. *Arch. Sex. Behav.* 41, 135–147. doi: 10.1007/s10508-011-9881-7
- Safron, A., Sylva, D., Klimaj, V., Bailey, J. M., Li, M., and Walter, M. (2017). Neural correlates of sexual orientation in heterosexual, bisexual, and homosexual men. *Sci. Rep.* 7:41314. doi: 10.1038/srep41314
- Sakamoto, H. (2012). Brain-spinal cord neural circuits controlling male sexual function and behavior. *Neurosci. Res.* 72, 103–116. doi: 10.1016/j.neures.2011.11.002
- Santtila, P., Jern, P., Westberg, L., Walum, H., Pedersen, C. T., Eriksson, E., et al. (2010). The dopamine transporter gene (DAT1) polymorphism is associated with premature ejaculation. *J. Sex Med.* 7(4 Pt 1), 1538–1546. doi: 10.1111/j.1743-6109.2009.01696.x
- Savic, I., Berglund, H., and Lindström, P. (2005). Brain response to putative pheromones in homosexual men. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 7356–7361. doi: 10.1073/pnas.0407998102
- Savic, I., García-Felgueras, A., and Swaab, D. C. (2010). Sexual differentiation of the human brain in relation to gender identity and sexual orientation. *Prog. Brain Res.* 186, 41–62. doi: 10.1016/B978-0-444-53630-3.00004-X
- Savic, I., and Lindstrom, P. (2008). PET and MRI show differences in cerebral asymmetry and functional connectivity between homo- and heterosexual subjects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 9403–9408. doi: 10.1073/pnas.0801566105
- Shulman, L. M., and Spritzer, M. D. (2014). Changes in the sexual behavior and testosterone levels of male rats in response to daily interactions with estrus females. *Physiol. Behav.* 133, 8–13. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.05.001
- Sutton, C. M., Ziegler, R. L., Austin, K. J., and Alexander, B. M. (2018). Quantitative comparison of TRPM8 positively stained neurons in the hypothalamus and amygdala of rams categorized behaviorally as low or high sexual performers. *Transl. Anim. Sci.* 2, S173–S174. doi: 10.1093/tas/txy021
- Swaab, D. F. (2008). Sexual orientation and its basis in brain structure and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 10273–10274. doi: 10.1073/pnas.0805542105
- Taziaux, M., Staphorsius, A. S., Ghattei, M. A., Bloom, S. R., Swaab, D. F., and Bakker, J. (2016). Kisspeptin expression in the human infundibular nucleus in relation to sex, gender identity and sexual orientation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101, 2380–2389. doi: 10.1210/jc.2015-4175
- Thonhauser, K. E., Raffetzeder, A., and Penn, D. J. (2019). Sexual experience has no effect on male mating or reproductive success in house mice. *Sci. Rep.* 9:12145. doi: 10.1038/s41598-019-48392-x
- Trejo-Sánchez, I. (2020). Dataset of male rat copulatory behavior. *Figshare*. doi: 10.6084/m9.figshare.12108984.v2
- Ventura-Aquino, E., and Paredes, R. G. (2017). Animal models in sexual medicine: the need and importance of studying sexual motivation. *Sex. Med. Rev.* 5, 5–19. doi: 10.1016/j.sxmr.2016.07.003
- Waldinger, M. D., and Olivier, B. (2005). Animal models of premature and retarded ejaculation. *World J. Urol.* 23, 115–118. doi: 10.1007/s00345-004-0493-x
- Waldinger, M. D., and Schweitzer, D. H. (2005). Retarded ejaculation in men: an overview of psychological and neurobiological insights. *World J. Urol.* 23, 76–81. doi: 10.1007/s00345-004-0487-8
- Walters, J. T., and Owen, M. J. (2007). Endophenotypes in psychiatric genetics. *Mol. Psychiatry* 12, 886–890. doi: 10.1038/sj.mp.4002068
- Walton, M. T., Lykins, A. D., and Bhullar, N. (2016). Beyond heterosexual, bisexual, and homosexual: a diversity in sexual identity expression. *Arch. Sex. Behav.* 45, 1591–1597. doi: 10.1007/s10508-016-0778-3
- Whalen, R. E. (1991). “Heterotypical behaviour in man and animals: concepts and strategies,” in *Heterotypical Behaviour in Man and Animals*, eds M. Haug, P. F. Brain, and C. Aron (London: Chapman and Hall).
- Whalen, R. E., Beach, F. A., and Kuehn, R. E. (1961). Effects of exogenous androgen on sexually responsive and unresponsive male rats. *Endocrinology* 69, 373–380. doi: 10.1210/endo-69-2-373
- Wilson, J. D., Griffin, J. E., Leshin, M., and George, F. W. (1981). Role of gonadal hormones in development of the sexual phenotypes. *Hum. Genet.* 58, 78–84. doi: 10.1007/bf00284153
- Yang, X., Gao, M., Zhang, L., Liu, L., Liu, P., Sun, J., et al. (2018). Central neural correlates during inhibitory control in lifelong premature ejaculation patients. *Front. Hum. Neurosci.* 12:206. doi: 10.3389/fnhum.2018.00206

- Zhang, B., Lu, J., Xia, J., Wang, F., Li, W., Chen, F., et al. (2017). Functional insights into aberrant brain responses and integration in patients with lifelong premature ejaculation. *Sci. Rep.* 7:460. doi: 10.1038/s41598-017-00421-3
- Zhou, J. N., Hofman, M. A., Gooren, L. J. G., and Swaab, D. F. (1995). A sex differences in the human brain and its relation to transsexuality. *Nature* 378, 68–70. doi: 10.1038/378068a0
- Zietsch, B. P., Westberg, L., Santtila, P., and Jern, P. (2015). Genetic analysis of human extrapair mating: heritability, between-sex correlation, and receptor genes for vasopressin and oxytocin. *Evol. Hum. Behav.* 36, 130–136. doi: 10.1016/j.evolhumbehav.2014.10.001

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Trejo-Sánchez, Pérez-Monter, Huerta-Pacheco and Gutiérrez-Ospina. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



## ANEXO 2

---

### Ligas a los repositorios con las bases de datos y códigos en R reportados

Toda la información reportada está disponible para el acceso público a través de repositorios en donde incluimos las bases de datos de los registros de parámetros copulatorios y del cálculo de expresión génica relativa tal como se utilizaron para los principales análisis realizados en R Studio. Del mismo modo, los códigos generados para obtener gráficos y los análisis matemáticos reportados se compilaron y están disponibles para su uso público, así como para que cualquier análisis incluido pueda ser replicado, supervisado o con fines pedagógicos y está disponible la vía de comunicación para discutir cualquier discrepancia.

#### 1. REPOSITORIO CON BASES DE DATOS.

- Base de datos de parámetros de conducta copulatoria registrados

*Trejo-Sánchez, Itztli (2020): Dataset of male rat copulatory behavior. figshare. Dataset. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.12108984.v2>*

- Base de datos de expresión génica relativa calculada mediante  $2^{-\Delta\Delta CT}$

*Trejo-Sánchez, Itztli (2020): Dataset of relative gene expression levels of AR, ESR1, PR, CYP19, DNMT1 and DNMT3a in limbic brain. figshare. Dataset. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.12196773.v2>*

#### 2. REPOSITORIO DE CÓDIGOS GENERADOS EN R.

- [github.com/ItztliSanchez/Trejo-Sanchez-2020](https://github.com/ItztliSanchez/Trejo-Sanchez-2020)
- [github.com/ItztliSanchez/Trejo-Sanchez-2020/blob/master/Heatmap-Dendrogram.R](https://github.com/ItztliSanchez/Trejo-Sanchez-2020/blob/master/Heatmap-Dendrogram.R)
- [github.com/ItztliSanchez/Trejo-Sanchez-2020/blob/master/PCA-Biplot.R](https://github.com/ItztliSanchez/Trejo-Sanchez-2020/blob/master/PCA-Biplot.R)

## ANEXO 3

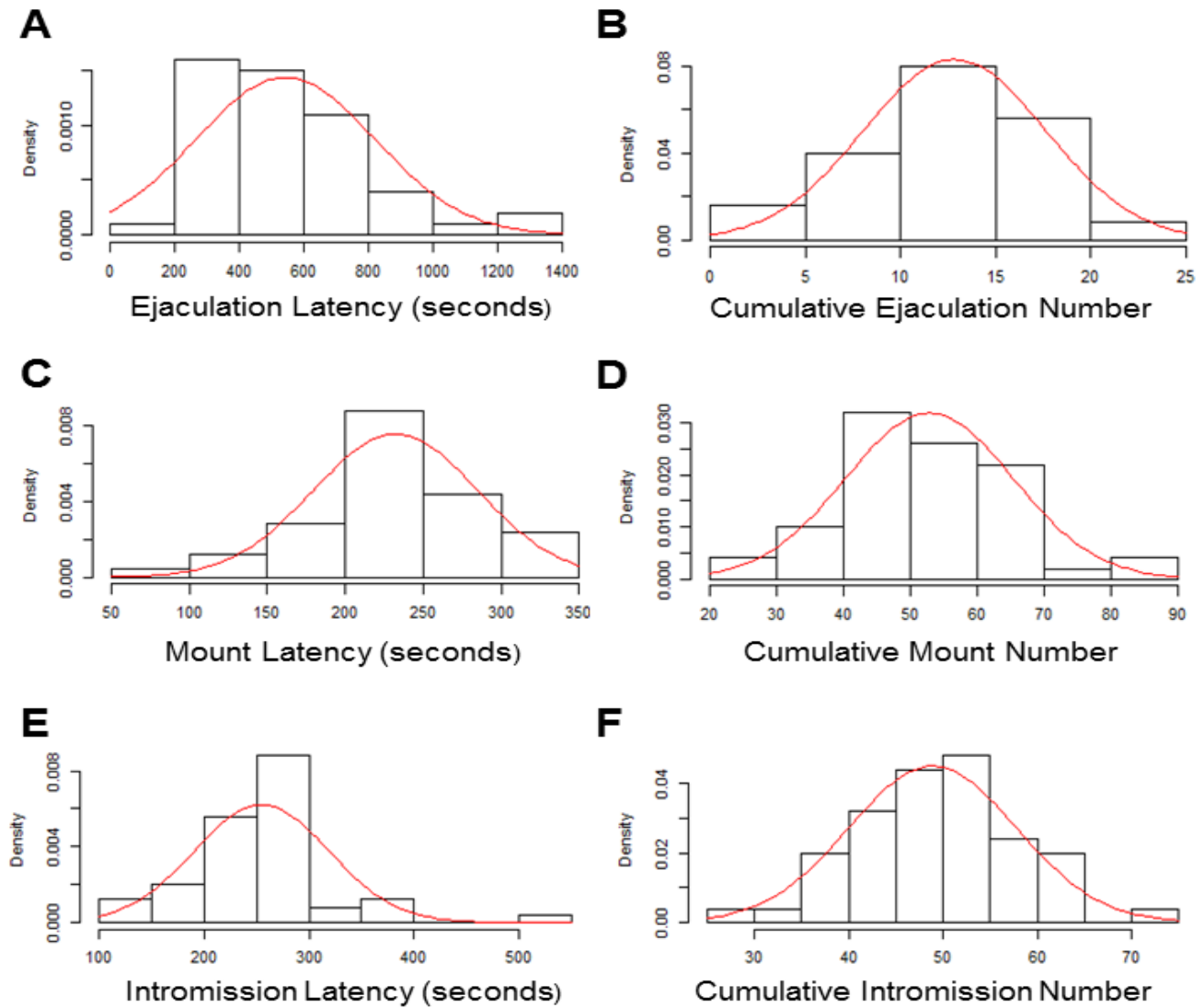
### Condiciones de amplificación para PCR cuantitativa

**Tabla 2. Condiciones de amplificación para Ywhaz, AR, ESR1, PR, CYP19, DNMT1 y DNMT3a por PCR cuantitativa**

Gen (No. GeneBank)	Oligonucleótidos	Tamaño del amplicón	Sonda UPL Roche	Ta	Dilución	Eficiencia	Pendiente
Ywhaz BC094305	5'-ctaccgctacttggtgagg-3' 3'-tgtgactggtccacaattcc-5'	63 nt	9	60°C 58°C	Sin diluir	2.3 2.1	-2.7 -3.1
AR NM_012502.1	5'-ggcgcttctaccagctca-3' 3'-gaattgatgcagctctcttgc-5'	68 nt	128	60°C	1:10	2.2	-2.7
ESR1 NM_012689.1	5'-tttcttaagagaagcattcaagga-3' 3'-ttatcgatggtgcattggtt-5'	72 nt	130	60°C	Sin diluir	2.1	-3.0
PR NM_022847.1	5'-ggcagctgcttcagtagtca-3' 3'-tggcatcgatgtgaagtcc-5'	70 nt	53	58°C	1:10	1.9	-3.5
CYP19 NM_017085.2	5'-ggaaatccacactgttgttg-3' 3'-tgaagtttccaccacttcaa-5'	77 nt	9	60°C	Sin diluir	2.0	-3.1
DNMT1 NM_053354.3	5'-aactcgtcttggttgagacct-3' 3'-gcgactgcaatacactgaa-5'	75 nt	55	60°C	1:100	1.8	-3.7
DNMT3a NM_00100395 8.1	5'-aacggaagcgggatgagt-3' 3'-actgcaatcaccttgctt-5'	70 nt	75	58°C	1:100	2.1	-2.9

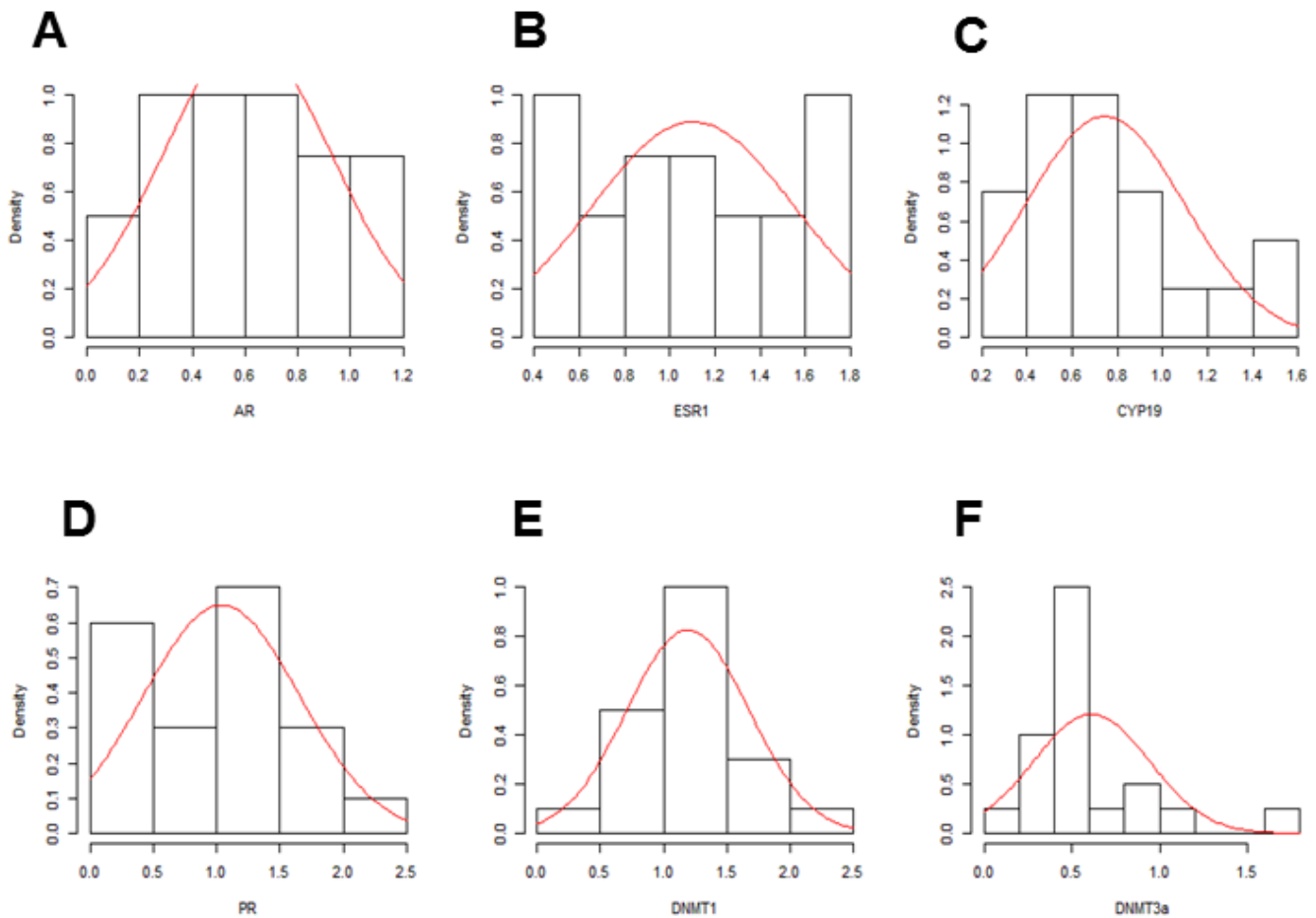
nt - Nucleótidos

Figuras suplementarias



Variable	Statistic	p-value	Normality
EL	0.9217	0.0027	NO
EN	0.9824	0.6545	YES
ML	0.9718	0.2747	YES
MN	0.9674	0.1816	YES
IL	0.8813	0.0001	NO
IN	0.9926	0.9876	YES

**FIGURA SUPLEMENTARIA 1. Distribución y normalidad de los parámetros de conducta copulatoria.** Histogramas con curvas de densidad de probabilidad para A. Latencia de eyaculación, B. Frecuencia de eyaculación, C. Latencia de monta, D. Frecuencia de monta, E. Latencia de intromisión, F. Frecuencia de intromisión. Tabla con los resultados de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk's para los parámetros evaluados.

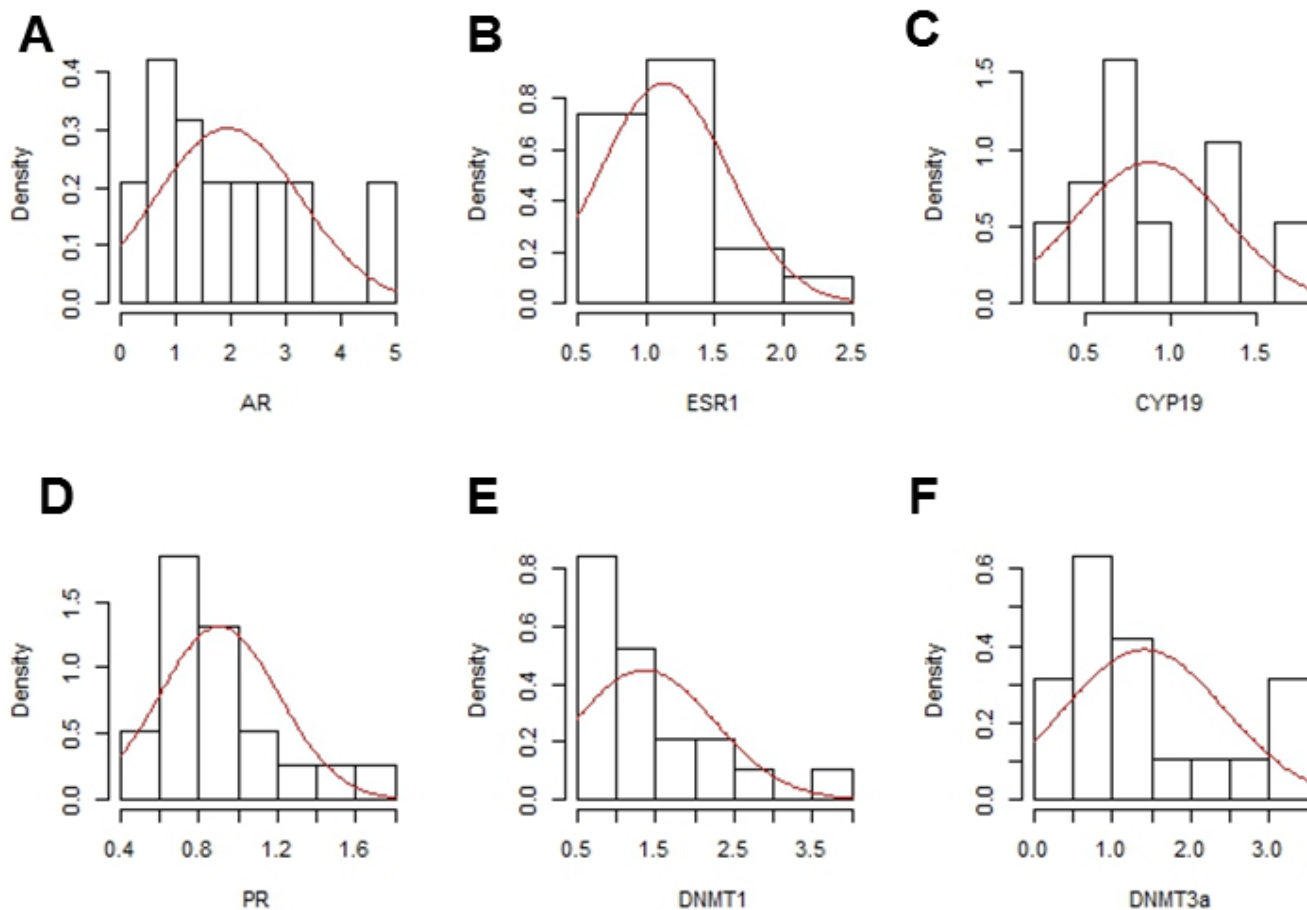


```
uniNorm(AMG.MNT, type = "SW", desc = TRUE)
```

```
$`Shapiro-Wilk's Normality Test`
```

	Variable	Statistic	p-value	Normality
1	AR	0.9408	0.2480	YES
2	ESR1	0.9192	0.0958	YES
3	CYP19	0.9124	0.0708	YES
4	PR	0.9279	0.1406	YES
5	DNMT1	0.9773	0.8949	YES
6	DNMT3a	0.8006	0.0009	NO

**FIGURA SUPLEMENTARIA 2. Distribución y normalidad de expresión génica en amígdala, AMG.** Histogramas con curvas de densidad de probabilidad para los datos de expresión génica relativa de A. Receptor de andrógenos, AR, B. Receptor de estrógenos alfa, ESR1, C. Aromatasa, CYP19, D. Receptor de progesterona, PR, E. DNA-metil-transferasa 1, DNMT1 y F. DNA-metil-transferasa 3a, DNMT3a. Tabla con los resultados de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk's para los genes evaluados.

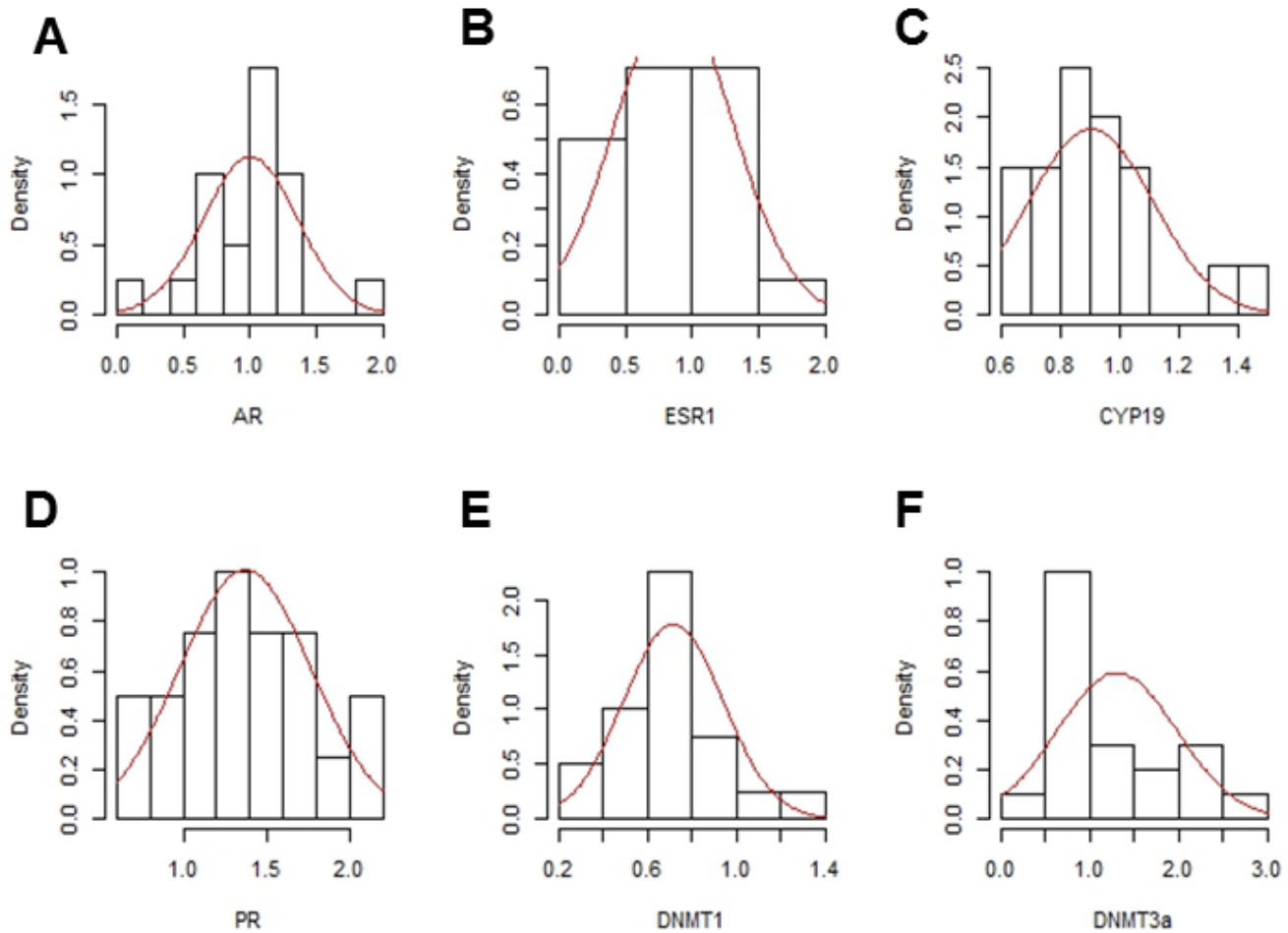


```
uniNorm(BO.MNT, type = "SW", desc = TRUE)
```

```
$`Shapiro-Wilk's Normality Test`
```

	Variable	Statistic	p-value	Normality
1	AR	0.9096	0.0727	YES
2	ESR1	0.8834	0.0246	NO
3	CYP19	0.9122	0.0812	YES
4	PR	0.9495	0.3880	YES
5	DNMT1	0.8520	0.0072	NO
6	DNMT3a	0.8683	0.0135	NO

**FIGURA SUPLEMENTARIA 3. Distribución y normalidad de expresión génica en bulbo olfatorio, OB.** Histogramas con curvas de densidad de probabilidad para los datos de expresión génica relativa de A. Receptor de andrógenos, AR, B. Receptor de estrógenos alfa, ESR1, C. Aromatasa, CYP19, D. Receptor de progesterona, PR, E. DNA-metil-transferasa 1, DNMT1 y F. DNA-metil-transferasa 3a, DNMT3a. Tabla con los resultados de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk's para los genes evaluados.

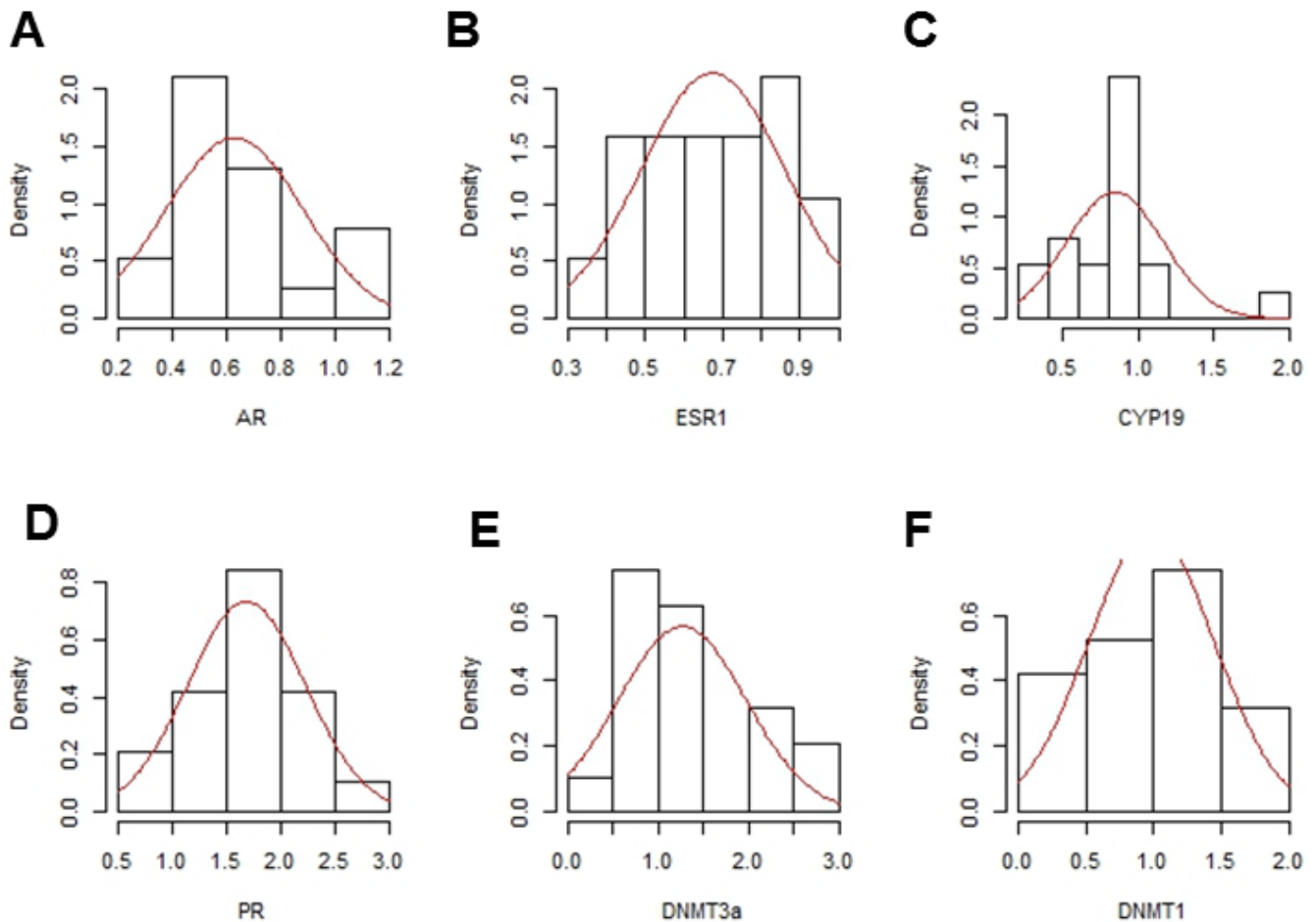


```
uniNorm(MPOA.MNT, type = "SW", desc = TRUE)
```

```
$`Shapiro-Wilk's Normality Test`
```

	Variable	Statistic	p-value	Normality
1	AR	0.9639	0.6248	YES
2	ESR1	0.9524	0.4051	YES
3	CYP19	0.9206	0.1018	YES
4	PR	0.9781	0.9066	YES
5	DNMT1	0.9648	0.6438	YES
6	DNMT3a	0.8713	0.0124	NO

**FIGURA SUPLEMENTARIA 4. Distribución y normalidad de expresión génica en área pre-óptica medial, MPOA.** Histogramas con curvas de densidad de probabilidad para los datos de expresión génica relativa de A. Receptor de andrógenos, AR, B. Receptor de estrógenos alfa, ESR1, C. Aromatasa, CYP19, D. Receptor de progesterona, PR, E. DNA-metil-transferasa 1, DNMT1 y F. DNA-metil-transferasa 3a, DNMT3a. Tabla con los resultados de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk's para los genes evaluados.

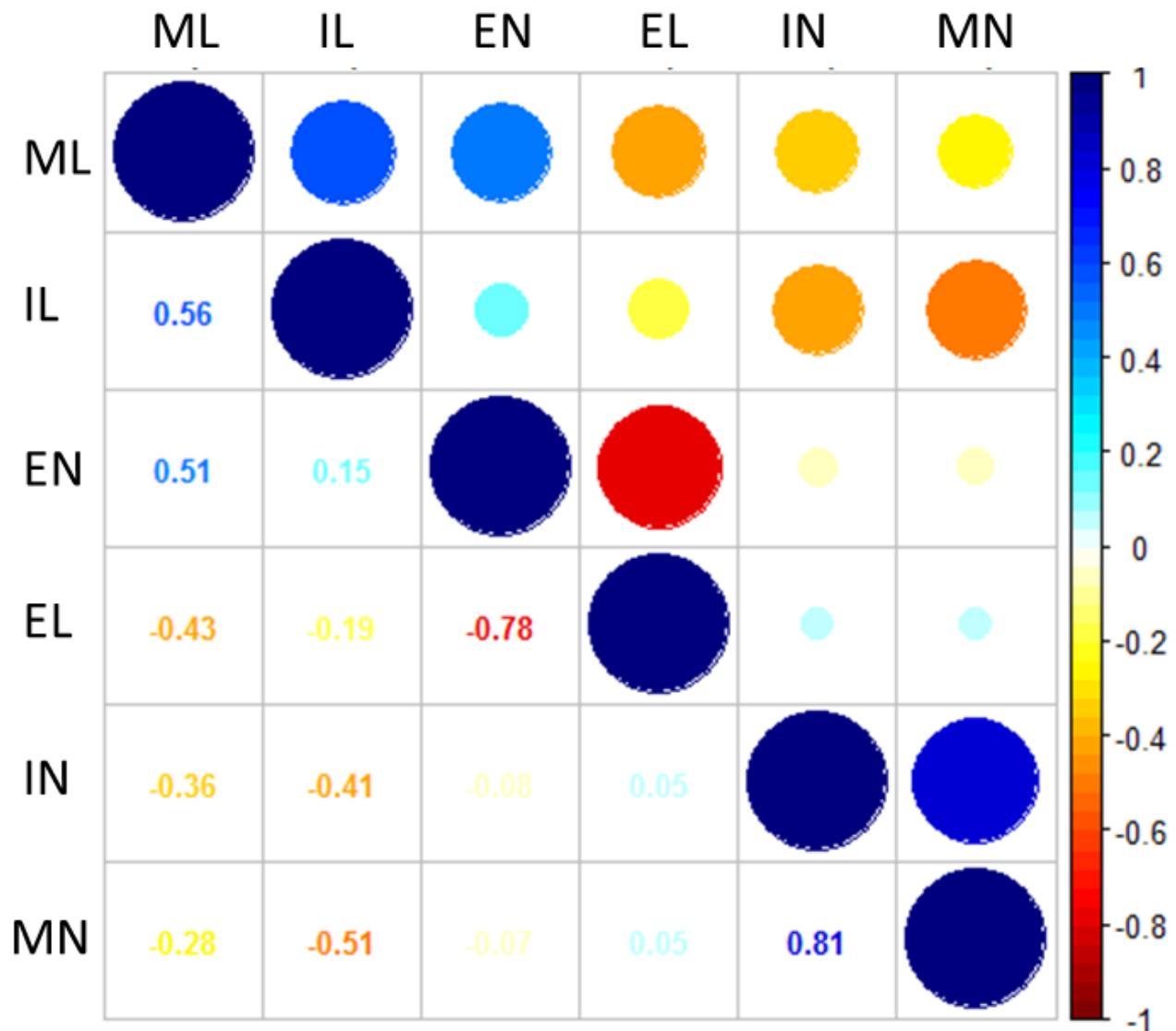


```
uniNorm(VMH.MNT, type = "SW", desc = TRUE)
```

```
$`Shapiro-Wilk's Normality Test`
```

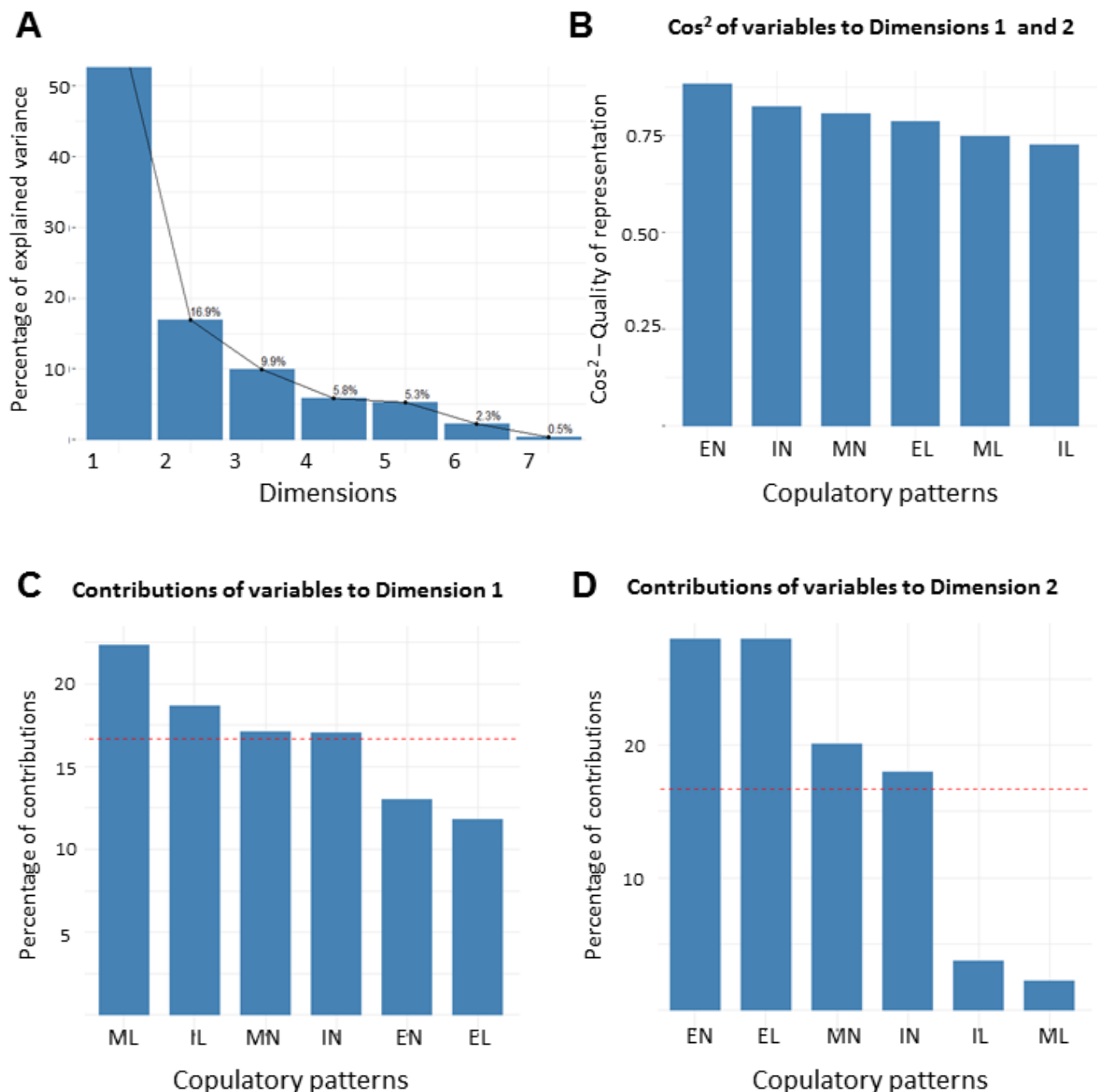
	Variable	Statistic	p-value	Normality
1	AR	0.9819	0.8924	YES
2	ESR1	0.6962	0.0000	NO
3	CYP19	0.7580	0.0000	NO
4	PR	0.9844	0.9399	YES
5	DNMT3a	0.9275	0.0534	YES
6	DNMT1	0.9571	0.2965	YES

**FIGURA SUPLEMENTARIA 5. Distribución y normalidad de expresión génica en hipotálamo ventro-medial, VMH.** Histogramas con curvas de densidad de probabilidad para los datos de expresión génica relativa de A. Receptor de andrógenos, AR, B. Receptor de estrógenos alfa, ESR1, C. Aromatasa, CYP19, D. Receptor de progesterona, PR, E. DNA-metil-transferasa 1, DNMT1 y F. DNA-metil-transferasa 3a, DNMT3a. Tabla con los resultados de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk's para los genes evaluados.

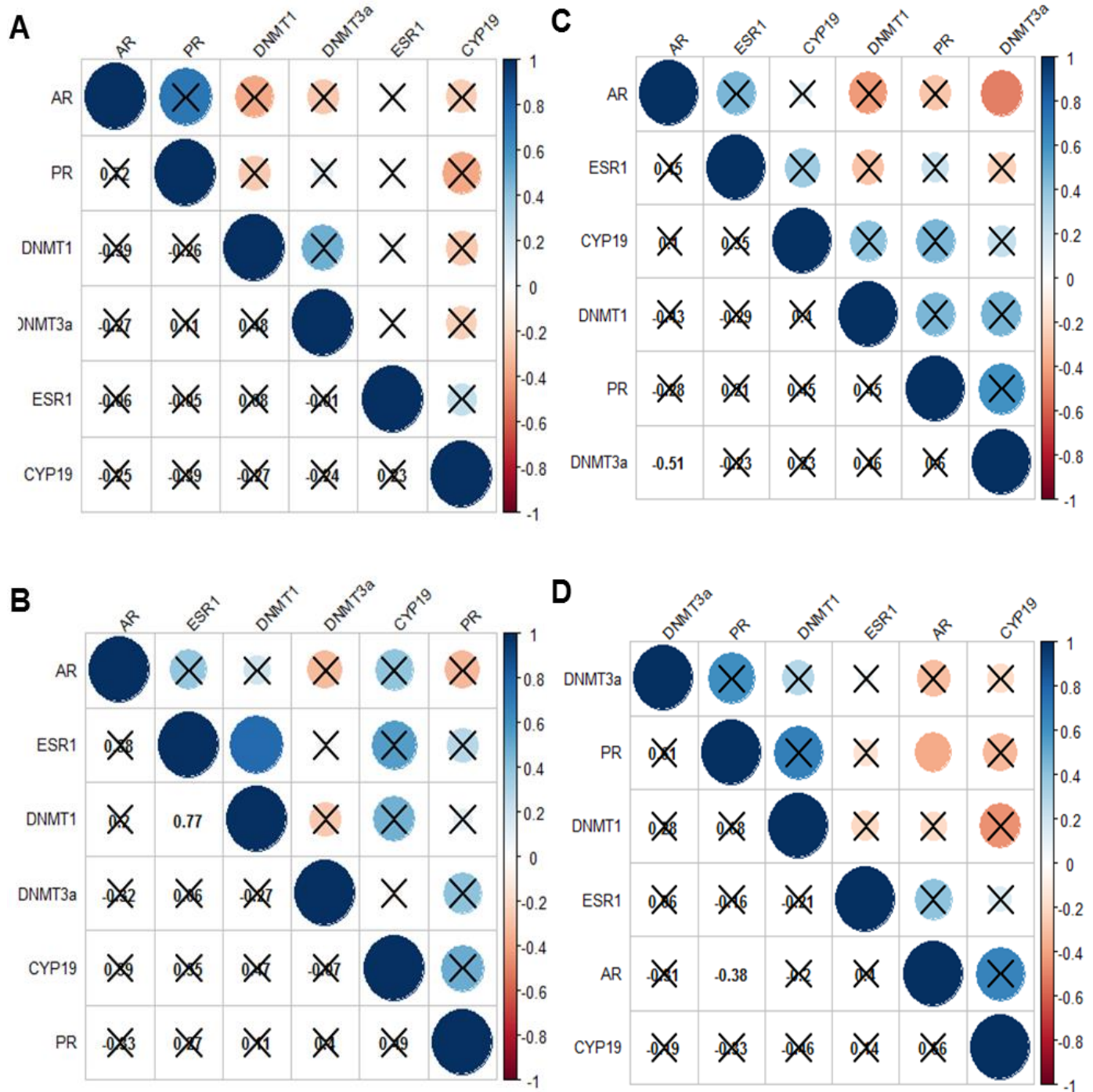


**FIGURA SUPLEMENTARIA 6. Diagrama de correlación entre los parámetros de conducta copulatoria.** Los círculos representan el grado de correlación entre los parámetros evaluados, entre más grande, mayor es la correlación, el color muestra si la correlación es positiva o negativa de acuerdo a la escala presentada en el margen derecho. Los círculos diagonales representan la correlación unitaria y debajo de éstos se encuentra el valor numérico para el coeficiente de correlación de Pearson con un intervalo de confianza del 95%. En los márgenes superior e izquierdo se abrevian los parámetros evaluados, ML, latencia de monta. IL, latencia de intromisión. EN, frecuencia de eyaculación. EL, latencia de eyaculación. IN, frecuencia de intromisión. MN, frecuencia de monta.





**FIGURA SUPLEMENTARIA 7. Gráficos de respaldo al análisis por componentes principales, PCA.** Realizamos un escrutino del análisis de PCA para verificar que el modelo es representativo del fenómeno de diversidad de conducta copulatoia de la rata macho. A. El porcentaje de la varianza explicada con más de 2 dimensiones es de menos del 10%. B. El coseno cuadrado indica la calidad de la represenetación de las varriables en el análisis,  $> 0.5$  indica una buuena representación en el modelo. C y D. Porcentaje de contribución de los parámetros conductuales a la dimensión o componente 1 (C) y al componente dos (D). ML, latencia de monta. IL, latencia de intromisión. EN, frecuencia de eyaculación. EL, latencia de eyaculación. IN, frecuencia de intromisión. MN, fecuencia de monta.



**FIGURA SUPLEMENTARIA 8. Diagrama de correlación de expresión génica relativa en A. Amígdala, B. Bulbo olfatorio, C. MPOA y D. VMH.** Los círculos representan el grado de correlación entre los parámetros evaluados, entre más grande, mayor es la correlación, el color muestra si la correlación es positiva o negativa de acuerdo a la escala presentada en el margen derecho. Los círculos diagonales representan la correlación unitaria y debajo de éstos se encuentra el valor numérico para el coeficiente de correlación de Pearson con un intervalo de confianza del 95% y nivel de significancia > 0.01 (tachadas). AR, receptor de andrógenos. ESR1, receptor de estrógenos alfa. CY19, aomatasa. PR, receptor de progesterona. DNMT1, DNA-metil-transferasa 1. DNMT3a, DNA-metil-transferasa 3a.