



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

CONDUCTA SEXUAL Y ACTIVIDAD CEREBRAL EVALUADA POR RESONANCIA
MAGNÉTICA POR INCREMENTOS DE MANGANESO (*MEMRI*) EN RATAS
HEMBRA DE LA CEPA WISTAR

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

LIC. JOSUÉ ALEJANDRO AGUILAR MORENO

DIRECTOR DE TESIS

DR. RAÚL G. PAREDES GUERRERO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

COMITÉ TUTOR

DRA. MARGARITA MARTÍNEZ GÓMEZ

CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA, UNIVERSIDAD DE TLAXCALA

DR. SARAEL ALCAUTER SOLÓRZANO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, QUERÉTARO, OCTUBRE 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

*A mi mamá, Margarita, que siempre me ha inspirado a seguir adelante
e ir por más.*

*A mi papá, Francisco, que me mostró que siempre hay algo que
aprender en el mundo.*

*A Verónica, que es un ejemplo a seguir y me motiva a seguir
creciendo.*

Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado gracias al apoyo por parte del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT), el cual otorgó la beca 766439.

Al comité tutor: la Dra. Margarita Martínez Gómez, por sus comentarios y observaciones durante las evaluaciones del avance del proyecto; al Dr. Sarael Alcauter por su paciencia y apoyo en el proceso de análisis de imágenes; y al Dr. Raúl Paredes por permitirme ser su alumno y dar toda la confianza y apoyo para desarrollar mi proyecto de doctorado.

A Francisco Javier Camacho Barrios por su asistencia técnica y apoyo en el manejo y preparación de los animales experimentales para este proyecto, así como por ser un gran amigo. A la Dra. Wendy Portillo por su apoyo, amistad y buenos consejos.

Al Laboratorio Nacional de Imagenología por Resonancia Magnética (LANIREM), al Dr. Luis Concha y al Dr. Juan Ortíz por el apoyo para realizar los experimentos de este proyecto. A la Unidad de Análisis Conductual, y a la Dra. Deisy Gasca por el apoyo en el desarrollo de este proyecto. A la unidad de Bioterio, MVZ. José Martín García Servín, Dra. Alejandra Castilla León y Dra. María A. Carbajo Mata por proporcionar y cuidar de los animales experimentales. A la Unidad de Apoyo Académico en TICS, ISC. Ramón Martínez Olvera, ISC. Omar González Hernández, Ing. María Eugenia Rosas Alatorre por el apoyo técnico. A Leopoldo González Santos y Ricardo Ríos por el apoyo en el uso de Don Clusterio. Al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, a la Dra. Nuri Aranda López.

A Mariana, Ana, Marco2, los Danis, que nos apoyamos e hicieron que la experiencia del doctorado y la estancia en Querétaro fuera mucho mejor. Gracias.

ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras	vii
Índice de tablas	ix
Lista de abreviaturas	x
Resumen	1
abstract.....	2
Capítulo 1. Conducta sexual femenina.....	2
1.1. Ciclo estral de la rata hembra	2
1.2. Componentes de la conducta sexual femenina en la rata hembra.....	5
1.3. Cópula regulada por la hembra.....	7
1.4. Control neural de la conducta sexual	9
1.5. Circuito socio-sexual y de recompensa.....	11
Capítulo 2. Imagenología por Resonancia Magnética.....	15
2.1. Mapeo de la actividad cerebral mediante resonancia magnética.....	16
2.2. Relajación longitudinal T1, medios de contraste y manganeso.....	17
2.3. Ventajas y desventajas de la administración de Mn ⁺²	20
Planteamiento del problema.....	22
Pregunta de investigación	23
Hipótesis General	23
Objetivo General	23
Objetivos particulares.....	23
Capítulo 3. Materiales y métodos	24
3.1. Sujetos	24
3.1.1. Ovariectomía.....	24
3.2. Experimento 1	24
Evaluar el efecto de las dosis de 8 y 16 mg/kg de MnCl ₂ sobre la conducta sexual, el ejercicio y la coordinación motriz de la rata hembra	24
3.2.1. Pruebas de conducta sexual.....	25
3.2.2. Rueda de ejercicio	27

3.2.3. Rotarod	27
3.2.4. Preparación y administración de MnCl ₂	28
3.2.5. Procedimiento Conductual	28
3.3. Experimento 2	29
Determinar la dosis de cloruro de manganeso que permita obtener la mejor señal posible	29
3.3.1. Preparación y administración de MnCl ₂	30
3.3.2. Prueba de conducta sexual	30
3.3.3. Adquisición de imágenes por resonancia magnética	30
3.3.4. Análisis de imágenes	31
3.3.5. Análisis por vóxel	33
3.3.6. D de Cohen.....	34
3.3.7. Procedimiento conductual.....	34
3.4. Experimento 3	35
Comparar por MEMRI los circuitos cerebrales que se activan en hembras que regulan y en aquellas que no regulan los contactos copulatorios	35
3.4.1. Preparación y administración de MnCl ₂	36
3.4.2. Prueba de exposición	36
3.4.3. Prueba de conducta sexual	36
3.4.4. Adquisición y análisis de imágenes por resonancia magnética	37
3.4.5. Procedimiento conductual.....	37
3.5. Análisis estadístico.....	39
Capítulo 4. Resultados	41
4.1. Experimento 1	41
4.1.1. Conducta sexual	41
4.1.2. Rueda de ejercicio	43
4.1.3. Latencia de caída en el Rotarod	44
4.2. Experimento 2	46
4.2.1. Conducta sexual	46
4.2.2. MEMRI	48
4.2.2.1. Bulbo Olfatorio	48

4.2.2.2. Núcleo de la cama de la estría terminal.....	49
4.2.2.3. Amígdala	49
4.2.2.4. Área preóptica medial.....	49
4.2.2.5. Hipotálamo ventromedial	50
4.2.2.6. Glándula pituitaria.....	50
4.2.2.7. Núcleo accumbens	53
4.2.2.8. Cuerpo estriado	53
4.2.2.9. Hipocampo	53
4.2.2.10. Área tegmental ventral.....	54
4.2.2.11. Porcentaje de cambio de señal	57
4.2.3. Análisis por circuitos cerebrales.....	58
4.2.3.1. Circuito socio-sexual.....	58
4.2.3.2. Circuito de recompensa.....	58
4.2.4. Análisis por vóxel y D de Cohen.	60
4.3. Experimento 3.....	63
4.3.1. Conducta sexual	63
4.3.2. MEMRI	65
4.3.2.1. Bulbo Olfatorio	65
4.3.2.2. Núcleo de la cama de la estría terminal.....	65
4.3.2.3. Amígdala	66
4.3.2.4. Área preóptica medial.....	66
4.3.2.5. Hipotálamo ventromedial	66
4.3.2.6. Núcleo accumbens	68
4.3.2.7. Cuerpo estriado	68
4.3.2.8. Hipocampo	68
4.3.2.9. Área tegmental ventral.....	69
4.3.3. Análisis por circuitos cerebrales.....	71
4.3.3.1. Circuito socio-sexual.....	71
4.3.3.2. Circuito de recompensa.....	73
4.3.4. D de Cohen.....	75
4.3.4.1. Cópula no regulada por la hembra	75

4.3.4.2. Cópula regulada por la hembra	77
Capítulo 5. Discusión.....	79
Bibliografía	85
anexo.....	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hormonas del ciclo estral.....	5
Figura 2. Reflejo de lordosis.....	7
Figura 3. Áreas cerebrales que pertenecen a los circuitos de recompensa y circuito socio-sexual	12
Figura 4. Relación de la intensidad de señal con el tiempo de recuperación de la señal T1 antes y después de la administración de MnCl ₂	19
Figura 5. Cajas de evaluación conductual.....	26
Figura 6. Esquema temporal del Experimento 1	29
Figura 7. Representación del proceso de análisis de imágenes de resonancia magnética.....	32
Figura 8. Esquema temporal del Experimento 2	35
Figura 9. Imagen representativa de las condiciones experimentales de los grupos del Experimento 3	37
Figura 10. Esquema temporal del Experimento 3	38
Figura 11. Resultados de la rueda de ejercicio	43
Figura 12. Resultados de Rotarod 10 rpm.....	44
Figura 13. Resultados de Rotarod 10-15 rpm	45
Figura 14. Ejemplos de las máscaras creadas.....	48
Figura 15. Diferencias de intensidad de señal en las regiones del circuito socio-sexual del grupo de conducta sexual de 8 mg/kg.....	51
Figura 16. Diferencias de intensidad de señal en las regiones del circuito socio-sexual del grupo de conducta sexual de 16 mg/kg.....	52
Figura 17. Diferencias de intensidad de señal en las regiones del circuito de recompensa del grupo de conducta sexual de 8 mg/kg	55
Figura 18. Diferencias de intensidad de señal en las regiones del circuito de recompensa del grupo de conducta sexual de 16 mg/kg	56
Figura 19. Análisis del cambio de intensidad de señal en la sesión 10 respecto a la sesión 1	57
Figura 20. Circuitos cerebrales.....	59
Figura 21. Mapas del tamaño del efecto de las diferencias en actividad neuronal entre grupos	61

Figura 22. Mapas del tamaño del efecto de las diferencias en actividad neuronal entre sesiones 1 y 10	61
Figura 23. Mapas del tamaño del efecto de las diferencias en actividad neuronal entre sesiones 10 y 5	62
Figura 24. Regiones individuales del circuito socio-sexual de los grupos del Experimento 3	67
Figura 25. Regiones individuales del circuito de recompensa de los grupos del Experimento 3	70
Figura 26. Circuito socio-sexual	72
Figura 27. Circuito recompensa	74
Figura 28. Mapas del tamaño del efecto de las diferencias en actividad neuronal entre sesiones 1 y 5 del grupo CNR.....	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Términos acuñados a lo largo de los años para describir la conducta sexual de la rata hembra	6
Tabla 2. Distribución de sujetos del Experimento 1	25
Tabla 3. Distribución de sujetos del Experimento 2.....	29
Tabla 4. Distribución de los sujetos del Experimento 3	36
Tabla 5. Parámetros de las pruebas de conducta sexual del Experimento 1	42
Tabla 6. Resultados de las pruebas de conducta sexual del Experimento 2.....	47
Tabla 7. Resultados de la prueba de conducta sexual del Experimento 3	64

LISTA DE ABREVIATURAS

%SE	Porcentaje de salidas después de eyaculación
%SI	Porcentaje de salidas después de intromisión
%SM	Porcentaje de salidas después de monta
α	Alfa
AMG	Amígdala
APOM	Área preóptica medial
ATV	Área tegmental ventral
B0	Campo magnético principal
BE₂	Benzoato de estradiol
BO	Bulbo olfatorio
BOA	Bulbo olfatorio accesorio
BOLD	Blood oxygenation level dependent
BOP	Bulbo olfatorio principal
Ca⁺²	Calcio
CE	Cuerpo estriado
CL	Cociente de lordosis
CNR	Cópula no regulada
CoGus	Corteza gustativa
CorRetro	Corteza retrosplenial
CoVis	Corteza visual
CR	Cópula regulada
CS	Conducta sexual
DP	Densidad de protones
E	Eyaculación
FLASH	Fast low angle shot sequence
fMRI	Functional magnetic resonance imaging
Gd⁺²	Gadolinio
H⁺	Hidrógeno
Hip	Hipocampo
HVM	Hipotálamo ventromedial
HVMA	Hipotálamo ventromedial anterior
I	Intromisión
III	Intervalo inter-intromisión

IML	Intensidad media de lordosis
KW	Kruskall-Wallis
LANIREM	Laboratorio nacional de imagenología por resonancia magnética
LE	Latencia de eyaculación
LI	Latencia de intromisión
LM	Latencia de monta
LRE	Latencia de regreso después de eyaculación
LRI	Latencia de regreso después de intromisión
LRM	Latencia de regreso después de monta
M	Monta
MEMRI	Manganese-enhanced magnetic resonance imaging
mg/kg	Miligramos por kilo
MGP	Materia gris periacueductal
ml/kg	Mililitro por kilo
Mn⁺²	Manganeso
MnCl₂	Cloruro de manganeso
MRI	Magnetic resonance imaging
Mz	Campo magnético neto
NAcc	Núcleo accumbens
NCET	Núcleo de la cama de la estría terminal
OV	Órgano vomeronasal
OVX	Ovarectomía
P	Progesterona
π	Pi
RF	Radiofrecuencia
ROI	Region of interest
Rpm	Revoluciones por minuto
sc	Subcutáneo
TE	Tiempo de eco
TR	Tiempo de repetición
UMW	U de Mann-Whitney

RESUMEN

La imagenología por resonancia magnética (IRM) es una técnica de neuroimagen que permite realizar estudios longitudinales, midiendo cambios plásticos en el mismo sujeto a través del tiempo. La IRM por incrementos de manganeso usa los iones de manganeso para identificar la actividad cerebral, pero en dosis altas puede inducir efectos neurotóxicos. El primer objetivo del presente trabajo fue determinar una dosis de cloruro de manganeso que no afecte el despliegue de la conducta sexual, de rueda de ejercicio y de coordinación motora (Rotarod, Experimento 1) a lo largo de 10 sesiones; el segundo objetivo fue determinar la dosis que permita medir la actividad cerebral de hembras que copulan en 10 sesiones; y el tercer objetivo fue identificar la actividad cerebral de hembras en diferentes condiciones de estimulación sexual en 10 sesiones. Los resultados del Experimento 1 mostraron que las dosis de 8 y 16 mg/kg administrados en las sesiones 1, 5 y 10 no generan alteraciones conductuales, en la conducta sexual (30 minutos), en la rueda de ejercicio (30 minutos) ni en la coordinación motriz (Rotarod) (3 minutos). Los resultados del Experimento 2 demostraron que la dosis de 16 mg/kg de cloruro de manganeso es adecuada para identificar la actividad neuronal después de la conducta sexual en las sesiones 1, 5 y 10 de las regiones de los circuitos de recompensa y de respuesta socio-sexual de la hembra después de copular (30 minutos). Finalmente, en el Experimento 3 fue posible identificar la actividad neuronal de las sesiones 1, 5 y 10 de hembras que fueron expuestas a un macho sexualmente experto, hembras que no regularon los contactos copulatorios y hembras que regularon los contactos copulatorios (60 minutos de cada prueba). Nuestros datos son los primeros en demostrar el efecto a largo plazo de la conducta sexual de la rata hembra, identificando los cambios sucedidos debido a la experiencia y cómo se modifica la función cerebral respecto a esta.

Palabras clave: Conducta sexual, resonancia magnética, plasticidad cerebral.

ABSTRACT

Magnetic resonance imaging (MRI) is a neuroimaging technique that makes it possible to perform longitudinal experiments, tracking plastic changes in the same subject across time. The manganese-enhanced MRI (MEMRI) uses the manganese ions properties to identify brain activity but in high doses can induce neurotoxic effects. The first objective of this work was establishing a dose of chloride manganese that does not interfere with the sexual behavior, running wheel and fine motor coordination (Rotarod) (Experiment 1) along 10 sessions; the second objective was establishing a dose that allows the measurement of brain activity of mating females; and the third objective was identifying the brain activity of female rats in different sexual stimulation conditions. The results of Experiment 1 showed that 8 and 16 mg/kg of chloride manganese administered on sessions 1, 5 and 10 do not produce behavioral alterations, sexual (30 min.), running wheel (30 min.) or Rotarod (3 min.). The results of Experiment 2 proved that 16 mg/kg is the most adequate dose to measure brain activity of reward and socio-sexual circuits after sexual behavior (30 min.) on sessions 1, 5 and 10. The results of Experiment 3 showed the differential brain activity of females exposed to a male, females that do not pace the sexual interaction and females that paced the sexual interactions (60 min. each test). Our data is the first to demonstrate the long-term effects of sexual behavior on the female rat, measuring plastic changes due sexual experience and how the brain function modifies due experience.

Key words: Sexual behavior, resonance magnetic imaging, brain plasticity.

CAPÍTULO 1. CONDUCTA SEXUAL FEMENINA

La conducta sexual femenina ha sido un tema de interés desde la antigüedad. Uno de los registros más antiguos en medicina son los Papiros de Kahun (o Lahun), que se remontan hacia el 1800 a.C., y donde se describen causas y tratamientos de diversos problemas reproductivos en la mujer (Pfaus, Jones, Flanagan-Cato, & Blaustein, 2015). Existen descripciones de cómo diferentes culturas buscaban entender la psicología y fisiología de la sexualidad humana (Pfaus et al., 2015). Actualmente se han desarrollado diferentes líneas de investigación para entender los mecanismos hormonales y neurales que subyacen y regulan la conducta sexual de la hembra. El objetivo de esta tesis es estandarizar una nueva técnica que permita medir los cambios de actividad cerebral a corto y largo plazo de hembras sexualmente receptivas en diferentes condiciones de estimulación sexual. Por las ventajas de conservación y reproducción en condiciones de laboratorio diferentes modelos animales como la rata se han utilizado para investigar los diversos componentes de la conducta sexual (Pfaus, Kippin, & Coria-Avila, 2003).

1.1. Ciclo estral de la rata hembra

En la naturaleza, el periodo de reproducción se puede inferir por el cambio en la conducta sexual de la hembra, que pasa de evitar el contacto sexual con los machos a presentar señales a sus congéneres para iniciar la cópula. Cuando las hembras buscan y permiten la cópula, se dice que están en “estro”, que viene del latín “oestrus”, que se puede traducir en “frenesí” (Nelson & Kriegsfeld, 2017). En condiciones de laboratorio, este cambio puede ser observado cuando una rata en estro es capaz de cruzar un piso electrificado o presionar una palanca múltiples veces para tener acceso a un macho, conducta que no se realiza por la misma hembra cuando no está en estro (Paredes & Vazquez, 1999). En pruebas de

preferencia de pareja, una hembra en estro pasará más tiempo cerca de un macho sexualmente activo que cuando la hembra no está en estro (Pfaus et al., 2003). Asimismo, un macho pasa más tiempo en la zona adyacente a la hembra sexualmente receptiva que al de una hembra no sexualmente receptiva. Una hembra en estro permitirá la cópula con el macho, caso contrario a una hembra que no está sexualmente receptiva que muestra agresividad hacia el macho (Carlson, 2013).

El ciclo estral de la rata hembra tiene una duración entre 4-5 días. El Estro dura 36 horas, y se considera la primera etapa del ciclo. Después sigue el Diestro con una duración de 48 horas, donde el primer día es llamado Diestro I y el segundo Diestro II, caracterizado por la reducción de células epiteliales cornificadas y mayor cantidad de leucocitos, así como mayor presencia de células epiteliales nucleadas. La siguiente fase es el Proestro, que dura 12 horas, caracterizado por la presencia de células epiteliales nucleadas y la drástica reducción de leucocitos; una característica externa es la desaparición de la delgada membrana vaginal. El final del Proestro coincide con el inicio del Estro conductual y el despliegue de la conducta sexual femenina (González-Flores, Hoffman, Delgadillo, Keller, & Paredes, 2017).

Inicialmente se desconocía cómo se regulaba el ciclo estral. Cuando inicia la investigación de la reproducción femenina, se descubrió que el ciclo estral estaba relacionado con la función de los ovarios, siendo estos los que producían los componentes químicos necesarios para generar los cambios en la función vaginal y la conducta de la hembra. Esta teoría fue confirmada con la ovariectomía, que es la remoción quirúrgica de los ovarios, causando la ausencia de la conducta reproductiva de la hembra (González-Flores et al., 2017).

Posteriormente se descubrió que la supresión de la conducta sexual femenina podía revertirse temporalmente con la reincorporación de los componentes ováricos que producían las hormonas que inducían la receptividad, que eran los folículos y el cuerpo lúteo. Cuando extractos de estos dos componentes eran administrados a

hembras que fueron ovariectomizadas, se presentaban los cambios fisiológicos de una hembra en estro: el crecimiento vascular en el tracto reproductivo, crecimiento uterino, hipersecreción del tracto genital, y crecimiento de las glándulas mamarias (Nelson & Kriegsfeld, 2017). Junto a estas características de una hembra en estro, se presentaba la receptividad sexual, confirmando la importancia de los folículos en la regulación de la conducta sexual femenina.

La sustancia en los folículos fue llamada estrógeno, un término referente a “sustancia generadora de estro”. Los estrógenos fueron las primeras hormonas esteroides en ser químicamente aisladas, por Doisy y Butendandt (1929), llamándola “estrona”, obtenida de la orina de mujeres embarazadas (Nelson & Kriegsfeld, 2017). La extracción de estrógeno directo de tejido ovárico se realizó por primera vez en 1936. Así fue como se estableció la importancia del estrógeno en la estimulación de la conducta sexual femenina.

Sin embargo, los primeros estudios que usaron la administración de estrógenos para inducir receptividad en hembras ovariectomizadas no lograron obtener el resultado esperado. A pesar de administrar grandes dosis de estrógenos las hembras no copulaban, surgió el interés en encontrar qué otro factor faltaba para estimular químicamente a la hembra. Fue hasta que se extrajeron los componentes del cuerpo lúteo y se administró en conejas ovariectomizadas que se obtuvo el resultado deseado, induciendo la receptividad (Micevych, Mermelstein, & Sinchak, 2017). La hormona esteroidea del cuerpo lúteo fue llamada progesterona, por inducir al estado progestacional. Así se descubrió que la progesterona trabajaba de forma suplementaria con el estrógeno para inducir la receptividad femenina. La Figura 1 ejemplifica los niveles de estrógeno y progesterona en las diferentes fases de ciclo en la rata hembra.

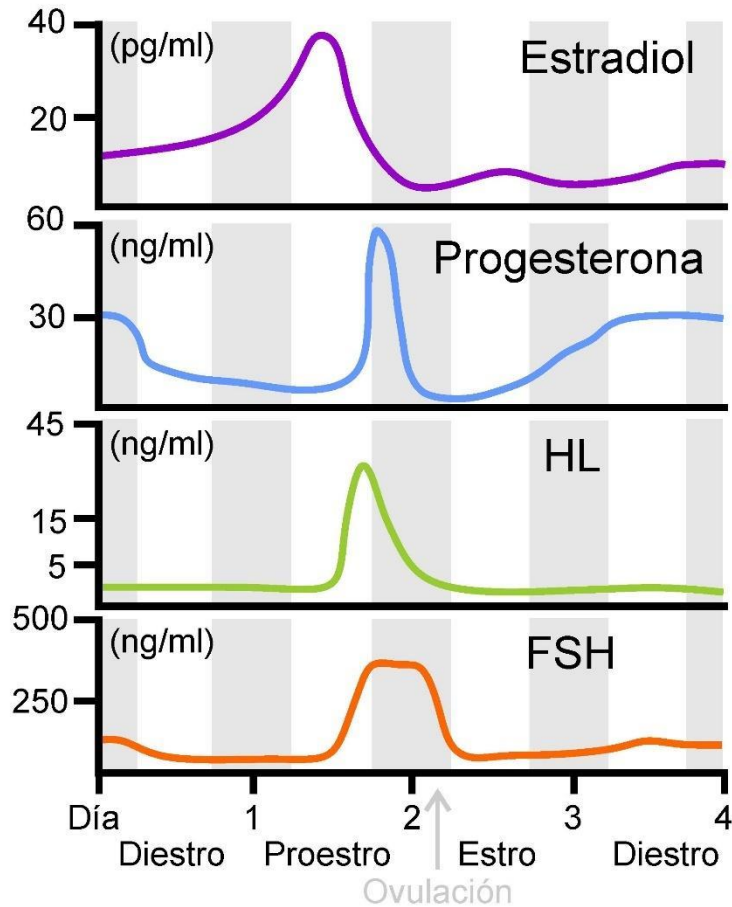


Figura 1. Hormonas del ciclo estral. Representación de los cambios de los niveles de estradiol, progesterona, la hormona luteinizante y la hormona foliculoestimulante en cada etapa del ciclo estral de la rata hembra (Donner & Lowry, 2013). Modificado de Donner y Lowry.

1.2. Componentes de la conducta sexual femenina en la rata hembra

La conducta sexual en la rata hembra es una conducta innata, que consta de patrones conductuales estereotipados. Diversos investigadores han descrito y conceptualizado la conducta sexual femenina, dividiéndola en (Tabla 1) dos componentes principales: la conducta proceptiva y la conducta receptiva. Las conductas proceptivas engloban todas las conductas que tienen como objetivo

atraer la atención del macho, incentivándolo a buscar el contacto con la hembra, sirviendo como indicador del estado motivacional de la hembra (Erskine, 1989).

En la rata hembra se observan conductas proceptivas caracterizadas por saltos, zigzagueos cerca y alrededor del macho, el orejeo y la emisión de sonidos ultrasónicos. En hembras ovariectomizadas es posible obtener el mismo efecto, con la administración de estrógeno y progesterona (Erskine, 1989).

Tabla 1. Términos acuñados a lo largo de los años para describir la conducta sexual de la rata hembra. Puede que, aunque cada autor combine u omita algunas características, de forma general están describiendo aspectos similares.

Autor	Componentes/Fases	Descripción
Beach, 1976	Atractividad	Estímulos conductuales y no conductuales atrayentes para los machos.
Beach, 1976	Proceptividad	
Madlafousek y Hlinak, 1977	Fase precopulatoria	Conductas realizadas por la hembra para atraer al macho e iniciar la cópula.
Wallen, 1990	Motivación sexual femenina	
Blaustein y Erskine, 2002	Conducta paracopulatoria	
Beach, 1976	Receptividad	Conductas que facilitan la cópula, la eyaculación del macho y el transporte de espermatozoides por la cavidad vaginal.
Madlafousek y Hlinak, 1977	Fase copulatoria	
Wallen, 1990	Iniciación sexual femenina	
Blaustein y Erskine, 2002	Conducta copulatoria	

Otro componente de la conducta sexual en la rata hembra es la receptividad que se caracteriza por la presencia del reflejo de lordosis. La lordosis, que viene del griego *lordos* que significa “inclinarse hacia atrás” (Carlson, 2013), se presenta tras la estimulación de los flancos traseros por parte del macho, y consiste en la dorsiflexión de la columna vertebral de la hembra, el desvío de la cola, permaneciendo inmóvil, acciones que facilitan la monta, intromisión y la eyaculación del macho. En ratas se ha establecido diversas clasificaciones para el grado de lordosis que ejecuta una hembra, como lo hicieron Hardy y DeBold que lo clasifican

en 0, 1 2 y 3 (Hardy & Debold, 1971). Trabajos de Paredes y colaboradores (Alvarado-Martínez & Paredes, 2018; Corona, Retana-Márquez, Portillo, & Paredes, 2016; Santoyo-Zedillo, Portillo, & Paredes, 2017) han probado que una clasificación de la lordosis en 0, 1 y 2 es eficiente para caracterizar la conducta receptiva de la rata hembra, siendo la lordosis 0 la ausencia de arqueamiento de la columna vertebral; la lordosis 1, la semi-flexión de la columna; y la lordosis 2, que es la completa dorsoflexión de la hembra ante la estimulación del macho. El reflejo de lordosis se mide en términos de cocientes, buscando la relación entre las montas que ejecuta el macho y la respuesta ante la monta, que se conoce como el cociente de lordosis (CL) (Corona et al., 2016).

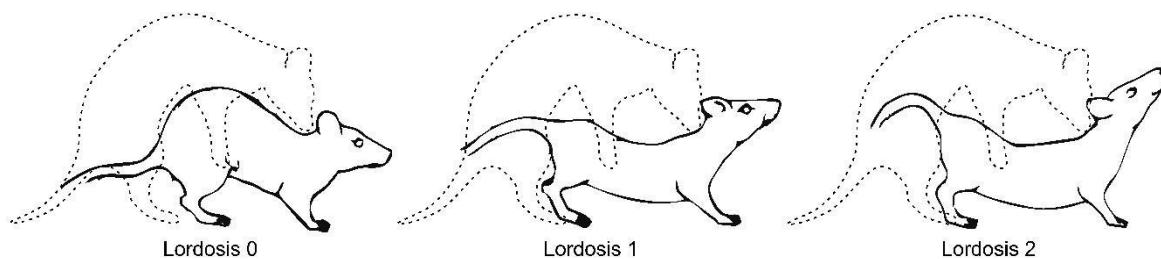


Figura 2. Reflejo de lordosis. Imagen representativa de los grados del reflejo de lordosis que presenta la rata hembra. Modificado de Hardy y De Bold, 1971.

1.3. Cópula regulada por la hembra

En condiciones naturales una rata hembra en estro estará sexualmente receptiva con cualquier macho o machos que se le presenten. Por esta razón se considera una especie sexualmente promiscua. Cuando hembras adultas permanecen mucho tiempo juntas pueden sincronizar su ciclo estral, copulando múltiples hembras al mismo tiempo con múltiples machos (Carlson, 2013). En condiciones naturales, las ratas tienen sus nidos bajo tierra, conectados por túneles, con zonas confinadas asignadas para el parto y la crianza, y espacios para los adultos (Nelson & Kriegsfeld, 2017). Es en las zonas donde habitan los adultos, machos y hembras,

donde copulan de forma libre, siendo las hembras las que eligen al macho con el que copularán, moviéndose entre zonas y túneles para atraer o alejar a los machos (Nelson & Kriegsfeld, 2017). Esta condición le permite a la hembra regular la cópula.

En condiciones de laboratorio es posible establecer un ambiente donde sea el macho o la hembra quien controle los contactos copulatorios (Alvarado-Martínez & Paredes, 2018; Erskine, 1989). Usando una caja con un macho en libre movimiento permite que sea éste el que regule la cópula. Usando una caja de las mismas características, pero con un panel que divide la caja en dos compartimentos y una apertura en el medio inferior del panel con dimensiones que permitan el paso de la hembra, pero no del macho, permite crear la condición donde la hembra regula la cópula (Paredes & Vazquez, 1999). Cada vez que haya un contacto copulatorio la hembra podrá escapar del compartimento del macho, y éste no tendrá posibilidad de perseguirla, siendo la hembra la que tiene el control de los contactos copulatorios (Erskine, Kornberg, & Cherry, 1989).

La cópula regulada por la hembra genera cambios fisiológicos que favorecen la reproducción (Erskine & Baum, 1982). Se ha reportado que cuando la hembra regula la cópula hay mayor éxito en la fertilización. Las hembras que regulan la cópula tienen mayor índice de éxito al entrar en estado pre-gestacional, así como mayor cantidad de crías por parto (Erskine et al., 1989). Se asume que es el intervalo y no la cantidad de intromisiones las que tienen mayor efecto en el éxito reproductivo. Una hembra que regula la cópula pasa tiempo alejada de un macho después de un contacto copulatorio, y esto será con relación a la intensidad de estimulación recibida. La monta genera la estimulación menos intensa, la intromisión la siguiente y la eyaculación la más intensa. La posibilidad de regular la estimulación sexual hará más eficiente la cópula, e incluso induce en la hembra estados afectivos positivos (placenteros), que no se producen cuando la hembra no regula el tiempo de la interacción sexual (Paredes & Gusati, 2008; Paredes & Vazquez, 1999). Además, la cópula regulada induce cambios plásticos permanentes como neurogénesis en los bulbos olfatorios y el hipocampo (Bedos,

Portillo, & Paredes, 2018; Portillo, Nuñez, Paredes, & Bedos, 2019). Estos resultados demuestran que la cópula regulada induce cambios fisiológicos y conductuales que favorecen la reproducción.

1.4. Control neural de la conducta sexual

El sistema olfatorio es fundamental para la supervivencia de los roedores. Permite la detección de depredadores, buscar y obtener alimento e identificar a sus congéneres, incluyendo parejas potenciales. Tanto el macho como la hembra son capaces de detectar las señales químicas producidas por sus congéneres, por lo que un macho puede percibir cuando una hembra está en estro y una hembra puede detectar un macho sexualmente experto (Asaba, Hattori, Mogi, & Kikusui, 2014). Esto es lo que consideraba Beach como “atracción” en su conceptualización de la conducta sexual de la hembra.

El bulbo olfatorio (BO) es la estructura que se encarga del procesamiento de claves químiosensoriales sexualmente relevantes. El BO se divide en dos estructuras principales: el bulbo olfatorio accesorio (BOA) y el bulbo olfatorio principal (BOP) (Arzate, Portillo, Corona, & Paredes, 2013). El BOA se compone de tres capas, una capa glomerular, la capa externa celular y la capa interna celular, y se encarga primordialmente del procesamiento de estímulos sexualmente relevantes. El BOP se divide en tres capas, la capa glomerular, la capa mitral y la granular; y se encarga de procesar, principalmente, señales sexualmente no relevantes, como alimento o depredadores (Arzate et al., 2013). Evidencias recientes demuestran que esta división anatómica funcional no es tan clara ya que se ha demostrado que ambos sistemas anatómicos pueden procesar claves químiosensoriales sexualmente relevantes, así como olores de alimentos y de depredadores. Las feromonas son señales químiosensoriales intraespecies para enviar mensajes específicos, donde el emisor modifica la conducta del receptor (De Pasqual, Groot, Mappes, & Burdfield-Steel, 2021). Las feromonas son liberadas por un individuo y pueden afectar la fisiología y conducta reproductiva de otros miembros de la misma especie.

La conducta exploratoria del roedor en el rostro y la región anogenital tiene como objetivo detectar señales químicas del otro individuo a través del olfato (Carlson, 2013). Estas señales son procesadas por el órgano vomeronasal (OV), que contiene un grupo de receptores sensibles a la presencia de moléculas volátiles y no volátiles. Los componentes químicos de la orina, saliva, lágrimas y las secreciones vaginales pueden ser detectados por el OV, activándose receptores específicos cuando se trata de orina de macho o hembra, lo cual indica que existen diferentes compuestos entre la orina que permiten la discriminación entre congéneres. El OV proyecta sus axones al BOA, que a su vez tiene conexión con el núcleo medial de la amígdala, y proyecta al área preóptica y al núcleo anterior del hipotálamo. Estas regiones se encargan del procesamiento de feromonas, y de la capacidad de identificar a una pareja sexualmente disponible.

Como se describió previamente, el reflejo de lordosis es el elemento principal de la conducta sexual de la rata hembra. Este reflejo se produce en una hembra sexualmente receptiva tras la estimulación de los flancos traseros y la estimulación vaginocervical por el macho (Parada, Chamas, Censi, Coria-Avila, & Pfaus, 2010). La monta del macho estimula los receptores de presión de los flancos de la hembra, que proyectan axones al ganglio de la raíz dorsal de la médula espinal. De la médula espinal viajan los impulsos nerviosos hacia la formación reticular medular, lo que activa neuronas motoras espinales, que estimulan los músculos de la espalda baja, generando la postura clásica de la lordosis (Georgescu, Sabongui, Corpo, Marsan, & Pfaus, 2009).

Se ha descrito que la lesión de regiones cerebrales suprime el reflejo de lordosis. El núcleo del hipotálamo ventromedial (HVM) (Georgescu & Pfaus, 2006), el área preóptica medial (APOM) y el hipotálamo ventromedial anterior (HVMA) (Paredes, 2003) son regiones identificadas como relevantes para el despliegue de la lordosis, teniendo conexiones con la formación reticular, cerrando el circuito que activa las neuronas motoras espinales. La amígdala medial (AMGm) recibe información somatosensorial de los genitales y manda impulsos a través de axones eferentes al

APM y al HVM (Carlson, 2013). EL HVM también tiene conexiones con la sustancia gris periacueductal (MGP). La lesión de la MGP suprime el reflejo de lordosis; la desconexión entre el HVM y la MGP inhibe la conducta sexual (Hennessey, Camak, Gordon, & Edwards, 1990).

1.5. Circuito socio-sexual y de recompensa

Cómo se describió anteriormente, existen diversas áreas cerebrales que se han identificado cómo participantes en aspectos específicos de la conducta sexual de la rata hembra. Pero estas regiones no trabajan de forma aislada, sino que tienen una interconexión con otras regiones que regulan distintos mecanismos y trabajan de forma coordinada para garantizar la supervivencia del individuo y de su especie.

La respuesta sexual está sujeta a la activación de dos circuitos principales: el circuito de respuesta socio-sexual y el circuito de recompensa. Como su nombre lo indica, cada uno de estos circuitos se activa y genera respuestas en diferentes condiciones, sin ser específicos de la conducta sexual, debido a que muchas de las regiones de estos circuitos cumplen funciones particulares dependiendo de la conducta a ejecutar, como el caso del circuito socio-sexual que abarca desde la agresión, la conducta sexual y el cuidado paterno, pero se asume que la estrecha relación entre estos dos circuitos tiene su origen en la evolución del sistema nervioso central (O'Connell & Hofmann, 2011).

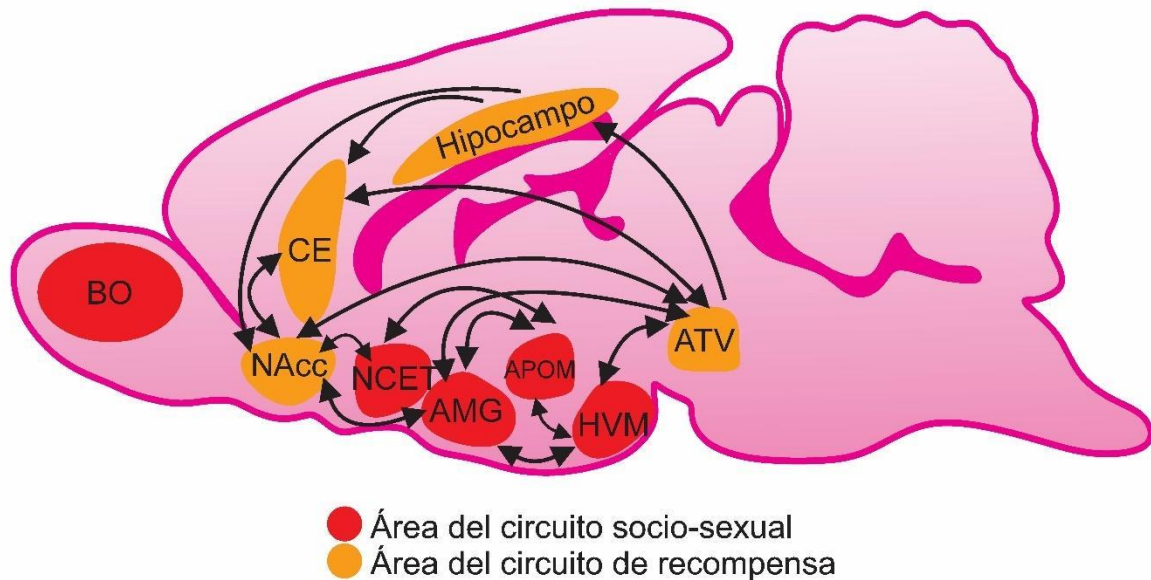


Figura 3. Áreas cerebrales que pertenecen a los circuitos de recompensa y circuito socio-sexual. Bulbo olfatorio, BO; núcleo de la cama de la estría terminal, NCET; amígdala, AMG; área preóptica medial, APOM; hipotálamo ventromedial, HVM; núcleo accumbens, NAcc; cuerpo estriado, CE; Hipocampo; área tegmental ventral, ATV. Modificado de O'Connell y Hoffmann, 2011.

De acuerdo con la clasificación de O'Connell y Hoffman (2011), las áreas que conforman el circuito socio-sexual son: el área preóptica medial (APOM), el hipotálamo ventromedial (HVM), la amígdala (AMG), el núcleo de la cama de la estría terminal (NCET). El área preóptica se asocia con conductas de agresión y cuidado paterno, pero también cumple una función importante en el despliegue de la conducta sexual (Erskine & Hanrahan, 1997; Rowe & Erskine, 1993). Se ha identificado que esta región se activa cuando la hembra recibe estimulación vaginocervical repetida, como sucede en la cópula. Esta activación se ve incrementada cuando la hembra regula los contactos copulatorios (Erskine & Hanrahan, 1997), lo cual indica que su actividad se incrementa en condiciones que inducen estados afectivos positivos, como lo es la cópula regulada por la hembra (Paredes & Vazquez, 1999). El hipotálamo ventromedial se encarga de regular la receptividad sexual de la hembra, ya que la lesión de esta área reduce la receptividad mientras que la estimulación facilita la lordosis (Pfaff & Sakuma, 1979). La amígdala tiene entradas de información del órgano vomeronasal, procesando

estímulos quimio-sensitivos, entre ellos los sexualmente relevantes que ayudan a la identificación de sus pares, enviando proyecciones hacia el núcleo de la cama de la estría terminal para modular conductas reproductivas. El NCET está interconectado con el hipotálamo y la amígdala, y aunque participa en funciones del circuito de recompensa, este es considerado parte del circuito socio-sexual por su rol en la conducta reproductiva (Erskine & Hanrahan, 1997; O'Connell & Hofmann, 2011; Portillo & Paredes, 2019).

El circuito de recompensa lo conforman diferentes regiones, incluye principalmente a el núcleo accumbens (NAcc), el cuerpo estriado (CE), el hipocampo (Hip) y el área tegmental ventral (ATV). El NAcc es considerado el centro de integración sensoriomotora, facilitando una respuesta adaptativa a los estímulos recibidos, tanto sociales como motivacionales. El cuerpo estriado participa de forma importante en el establecimiento de aprendizajes reforzados y en la expresión de conductas motivadas. El hipocampo es el centro por excelencia para la generación y procesamiento de la memoria, convirtiéndolo en un punto clave para el almacenamiento de información asociada a estímulos reforzantes. El ATV es considerado el centro del sistema dopaminérgico de recompensa (O'Connell & Hofmann, 2012) teniendo una función vital en la conducta reproductiva. Estudiar el circuito de recompensa es vital para comprender que existen más áreas cerebrales que se activan a causa de la conducta sexual. La relevancia de este circuito es que ayuda a la integración de la información obtenida del ambiente, generando una respuesta adecuada a la estimulación recibida, así como el almacenamiento de esta información para modular y modificar la repetición de las mismas conductas.

Se ha propuesto la interacción de áreas del circuito socio-sexual y de recompensa como moduladores de la motivación sexual (Portillo & Paredes, 2019), donde participa el bulbo olfatorio, el NCET, la amígdala y el área preóptica, componentes del circuito socio-sexual, y el núcleo accumbens y el ATV, correspondiente al circuito de recompensa. Se ha demostrado que en macho no copuladores no tienen alteraciones en los niveles plasmáticos de testosterona o estradiol, pero si

alteraciones en los receptores a estas hormonas, modificando la actividad de estas áreas ligadas a la motivación sexual (Portillo & Paredes, 2019). Estos datos nos ayudan a conocer cómo estas regiones actúan en función a la estimulación recibida.

La exploración de estas y otras regiones cerebrales implicadas en la conducta sexual puede ser investigada de forma más eficiente con la implementación de técnicas de neuroimagen, como la imagenología por resonancia magnética, la cual permite obtener imágenes de todo el cerebro en diferentes etapas experimentales, midiendo no sólo los cambios respecto a un grupo control, sino cambios en el mismo sujeto a través del tiempo.

CAPÍTULO 2. IMAGENOLOGÍA POR RESONANCIA MAGNÉTICA

La técnica de imagenología por resonancia magnética (IRM) (*MRI* por sus siglas en inglés) permite el estudio de seres vivos sin requerir su sacrificio. Una de las áreas en las que más se ha destacado la *MRI* son las neurociencias, permitiendo el estudio del sistema nervioso central, tanto en humanos como en animales. Esto se debe a que uno de los compuestos principales del cerebro es agua (Boretius & Frahm, 2011). Las aplicaciones de los principios de la resonancia magnética pueden ser utilizadas para obtener distintos tipos de información: la medición de cambios anatómicos y volumétricos de distintos componentes del cerebro, como la materia blanca, la materia gris y el líquido cefalorraquídeo, así como de regiones específicas. También permite medir la perfusión del agua a través de los axones, y las características del sistema vascular, por mencionar algunas (McRobbie, Moore, Graves, & Prince, 2006). La detección de la actividad funcional ha sido una de las aplicaciones de la IRM que más atención ha tenido (Uludag, Dubowitz, & Buxton, 2005), haciendo posible el rastreo de la actividad cerebral durante una tarea específica.

La *MRI* es una técnica que utiliza el principio de Resonancia Magnética Nuclear de la materia (Pohmann, 2011). Es utilizada para obtener información de una muestra orgánica o inorgánica, de sus características físicas como químicas, y fue descrita por Félix Boch y Edward Purcell en 1946 (McRobbie et al., 2006). El principio de la imagenología por resonancia magnética tiene como base la excitación de los átomos de hidrógeno (H^+) mediante pulsos de radiofrecuencia (McRobbie et al., 2006). El hidrógeno es el elemento que tiene mayor presencia en un organismo vivo, siendo el componente principal de las moléculas de agua. Los átomos de H^+ poseen un movimiento angular intrínseco llamado spin (Boretius & Frahm, 2011), y todos giran, o precesan, a una frecuencia definida, produciendo un momento magnético. Los momentos magnéticos de los átomos de hidrógeno se encuentran aleatoriamente alineados, sin embargo, cuando están en presencia de un campo

magnético de mayor intensidad, conocido como campo magnético principal (β_0) (Boretius & Frahm, 2011; McRobbie et al., 2006), estos momentos magnéticos se alinearan en dirección de β_0 , de igual manera que una brújula se alinea al campo magnético de la Tierra, causando la suma temporal de los momentos magnéticos produciendo un campo magnético neto (M_z) (Pohmann, 2011).

La señal obtenida será resultado de la interacción entre la muestra y el campo magnético (McRobbie et al., 2006). El tiempo de recuperación, o relajación de la muestra producirá la señal y el contraste entre los componentes de la muestra. Las imágenes obtenidas por resonancia magnética poseen contraste intrínseco, que es propio de las características de la muestra, teniendo variaciones en el tiempo de relajación dependiendo de las moléculas a las que este acoplado el H^+ , siendo clara la diferencia entre materia gris, materia blanca, líquido cefalorraquídeo, etc. Estas diferencias de composición química determinan la información obtenida de la muestra. Para obtener información de tejidos específicos se utilizan diferentes valores en los pulsos de radiofrecuencia, obteniendo secuencias específicas. De estas secuencias se obtienen valores de densidad de protones (DP); el tiempo de relajación longitudinal, conocido como T1; el tiempo de relajación transversal, T2; y el movimiento molecular, Difusión y Perfusión (McRobbie et al., 2006). Estas características de la muestra pueden ser manipuladas mediante los tiempos de repetición (TR) de los pulsos de radiofrecuencia, el intervalo entre el impulso excitador y la cúspide del eco (TE), y el ángulo de inclinación del pulso excitador (α) (McRobbie et al., 2006; Pohmann, 2011). Esta es la base de la señal en la imagenología por resonancia magnética.

2.1. Mapeo de la actividad cerebral mediante resonancia magnética

La Imagenología por Resonancia Magnética Funcional (*fMRI*, por sus siglas en inglés) detecta los cambios que presenta la hemoglobina con relación al oxígeno.

Este fenómeno fue descubierto por Pauling y Coryell en 1932, mucho antes que se descubriera la resonancia magnética nuclear (Uludag et al., 2005). Posteriormente Thulborn y colaboradores demostraron en 1982 la presencia de cambios en el tiempo de relajación transversal T2 en la presencia de desoxihemoglobina, pero no fue hasta 1990 que fue posible aplicarlo en imagenología funcional (Uludag et al., 2005). La señal BOLD (del inglés *Blood Oxygen Level Dependent*) consiste en rastrear la actividad metabólica de áreas cerebrales en estado de reposo o al momento de realizar una tarea (McRobbie et al., 2006). Este fenómeno sucede cuando la sangre oxigenada (oxihemoglobina, hemoglobina unida a oxígeno) libera oxígeno en las áreas con mayor actividad metabólica, pasando de ser oxihemoglobina a desoxihemoglobina. En este estado, la desoxihemoglobina se convierte en un elemento paramagnético, produciendo una distorsión del campo magnético local (McRobbie et al., 2006). Este cambio en el campo magnético produce una alteración en la señal T2 emitida, resultando en mayor señal en el área activa.

Desafortunadamente, la señal BOLD tiene sus limitaciones experimentales (Kuo, Herlihy, So, & Bell, 2006). La principal limitación es que la estimulación o tarea a realizar debe presentarse al mismo tiempo que la adquisición de las imágenes, limitando así estudios que conlleven actividad motriz y movimiento libre del animal, por lo que debe emplearse otra estrategia para que el sujeto experimental pueda realizar la tarea, así como obtener su actividad funcional cerebral.

2.2. Relajación longitudinal T1, medios de contraste y manganeso

En un tejido normal, los valores T1 están relacionados con la concentración en macromoléculas, uniones de agua y contenido de agua (McRobbie et al., 2006). Debido a esto, en el contraste del cerebro en una imagen T1 la mielina causa que la materia gris tenga una señal T1 más corta. La adquisición de imágenes ponderadas a T1 se logra utilizando diversas secuencias de pulsos, donde la

repetición de los pulsos de secuencias lleva a la atenuación progresiva por saturación de la señal (McRobbie et al., 2006).

Moléculas que contienen elementos paramagnéticos, medios de contraste como el gadolinio (Gd^{+2}) causan un incremento del campo magnético local, causando una relajación longitudinal más rápida (Aoki, Wu, Silva, Lynch, & Koretsky, 2004; Jasanoff, 2005). Un medio de contraste es un elemento que modifica el tiempo de relajación de los protones de H^+ que lo rodean (Jasanoff, 2005), creando una alteración del campo magnético local, modificando el tiempo de relajación transversal (T_2) y longitudinal (T_1) e incrementando la relación señal-ruido (Chuang, Belluscio, & Koretsky, 2010). La relajación T_1 incrementa proporcionalmente a la concentración del medio de contraste, lo que hace posible medir el cambio de T_1 en relación con la concentración del medio de contraste. El resultado del uso de agentes de contraste en imágenes ponderadas a T_1 es la hiper-intensidad de señal en las áreas donde el medio de contraste se acumula (Silva, Lee, Aoki, & Koretsky, 2004; Zubcevic et al., 2017), identificado como áreas con mayor brillo. Los primeros estudios donde se utilizaron iones paramagnéticos como medios de contraste fueron realizados por Eisinger y colaboradores en 1961 y por Cohn y Leigh en 1962 (Mildvan & Cohn, 1963).

Recientemente se ha propuesto un nuevo método para el rastreo de la actividad funcional del cerebro, utilizando manganeso (Mn^{+2}) como medio de contraste por sus características paramagnéticas, similares al Gd^{+2} . Además el Mn^{+2} es un análogo del calcio (Ca^{+2}) (Zubcevic et al., 2017), entrando a las células activas por vía de canales de calcio (Aoki et al., 2004; Eschenko et al., 2010a; Lin & Koretsky, 1997; Takeda, Kodama, Ishiwatari, & Okada, 1998). El conjunto de características biológicas como magnéticas del Mn permite identificar las regiones con mayor presencia de este ion durante la activación cerebral relacionada a la ejecución de una tarea (Lin & Koretsky, 1997).

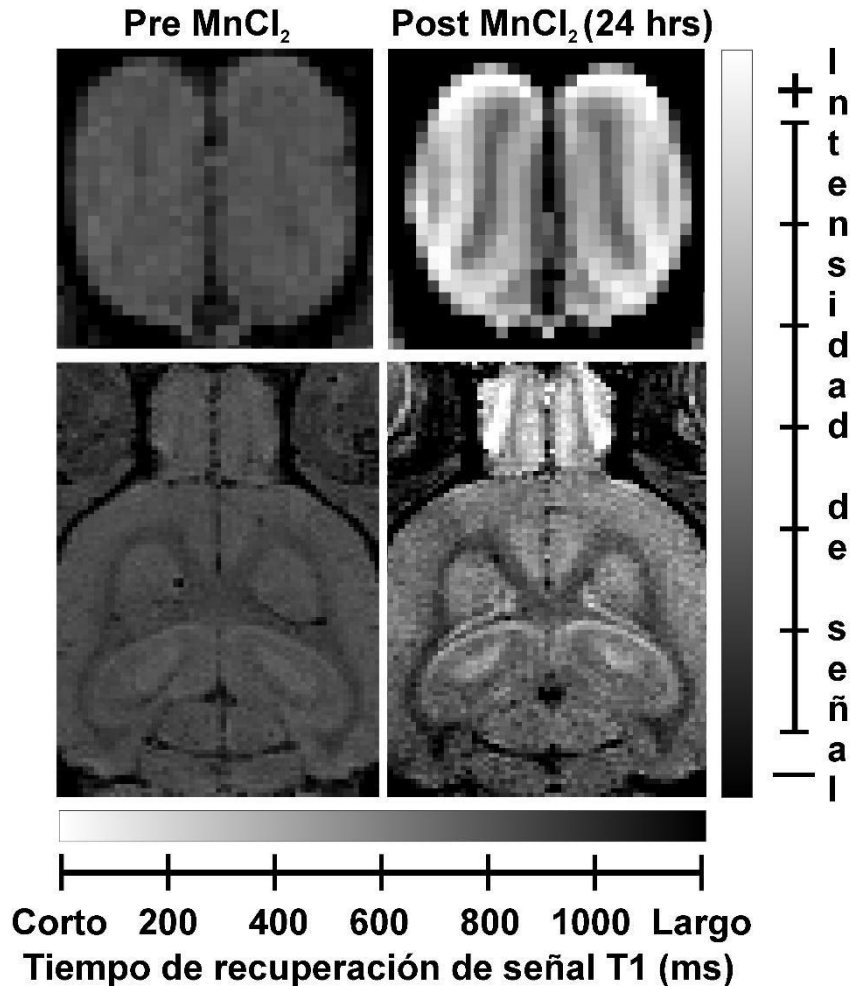


Figura 4. Relación de la intensidad de señal con el tiempo de recuperación de la señal T1 antes y después de la administración de MnCl₂. A menor tiempo de relajación, mayor será la intensidad de señal, incrementando el contraste en las áreas con mayor absorción del medio de contraste.

Estas características dan pie a la realización de estudios de resonancia magnética funcional distintos al BOLD (Kuo et al., 2006). Los cambios en la señal obtenida son producidos por la actividad neuronal y no por cambios en el nivel de oxigenación de la sangre, pues el Mn⁺² se acumula en las células activas. Además la manipulación experimental puede hacerse dentro y fuera del resonador, ya que una vez que el Mn⁺² está dentro de la neurona, se liga a diferentes proteínas y debido a su transporte lento, se puede realizar la adquisición de imágenes posterior a la tarea,

siendo aún posible detectar las áreas cerebrales que se activan durante la conducta (Chuang et al., 2010; Eschenko et al., 2010a; Zubcevic et al., 2017).

2.3. Ventajas y desventajas de la administración de Mn^{+2}

Como ya se mencionó el Mn^{+2} es análogo del Ca^{+2} , compartiendo algunas de sus características. El Mn^{+2} tiene un radio similar al Ca^{+2} , y está involucrado en diversos procesos en el organismo. Además, el Mn^{+2} es capaz de entrar en células despolarizadas a través de canales de calcio dependientes de voltaje, acumulándose en células activas. De esta manera es posible mapear la actividad cerebral producida.

Sin embargo, el uso de Mn^{+2} como medio de contraste en estudios de resonancia magnética en animales implica la adición de variables que pueden intervenir con los resultados experimentales. La administración mediante inyección (subcutánea, intraperitoneal o intravenosa) puede causar irritación en la piel, y lesiones en el sitio de la inyección, desde la primera administración. Puede también causar efectos tóxicos en corazón, hígado y otros órganos vitales. A nivel conductual puede afectar la motricidad del sujeto, presentando letargia, dificultad para el movimiento; y en casos más extremos se ha reportado pérdida de peso y muerte del individuo (Shukakidze, Lazriev, & Mitagvariya, 2003).

Los efectos del Mn^{+2} dependen de la dosis y la vía de administración utilizadas (Shukakidze et al., 2003). En la literatura se han reportado diferentes dosis y vías de administración para estudios de resonancia magnética utilizando Mn^{+2} como medio de contraste (MEMRI). No existe una dosis estándar que se pueda utilizar en este tipo de estudios, además es necesario determinar la secuencia de pulsos que sea ideal para identificar los cambios en el campo magnético producidos por el manganeso. Esto hace necesario realizar estudios para evaluar el efecto de diferentes dosis de Mn^{+2} en la motricidad y conductas motivadas de los sujetos.

Algunos trabajos han determinado que la dosis de 16 mg/kg de cloruro de manganeso no afecta la conducta motora de ratas macho (Eschenko et al., 2010b), pero se desconoce su efecto en la rata hembra y su conducta sexual. También es necesario determinar la dosis que no produzca alteraciones conductuales y que permita obtener una intensidad de señal óptima en resonancia para la identificación de estructuras cerebrales en diferentes condiciones experimentales.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La activación de mecanismos neurales por la conducta sexual de la rata hembra ha sido descrita por medio de diferentes técnicas que incluyen, entre otras, lesiones y mediciones de genes de expresión temprana como c-fos. Muchas de estas técnicas tienen la limitante que el sujeto no puede ser evaluado en diferentes sesiones.

El uso de cloruro de manganeso ($MnCl_2$) como medio de contraste ayuda a identificar la actividad neuronal por la modificación del campo magnético local, acortando la señal T1. Pero el uso de $MnCl_2$ puede traer consigo efectos secundarios que dificulten la interpretación de los resultados. Encontrar una dosis que no genere alteraciones conductuales es vital para el uso de $MnCl_2$ como medio de contraste. La falta de trabajos que usen MEMRI para evaluar la actividad neuronal de la rata hembra después de pruebas de conducta sexual hace necesario determinar la dosis adecuada para detectar cambios plásticos.

Con la identificación de una dosis que no afecte la conducta motora ni sexual de la rata hembra, será posible identificar cambios plásticos a corto y largo plazo que suceden en la hembra producto de la cópula, permitiendo la identificación de los circuitos cerebrales activos en diferentes condiciones de estimulación sexual.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El incremento en la experiencia sexual de la rata hembra que regula la cópula inducirá mayor actividad cerebral evaluada por resonancia magnética por incrementos de manganeso (MEMRI, por sus siglas en inglés)?

HIPÓTESIS GENERAL

La experiencia sexual incrementará la activación de los circuitos socio-sexual y de recompensa que controlan la conducta sexual de ratas hembra evaluadas con imágenes de resonancia magnética

OBJETIVO GENERAL

Evaluar cambios en la activación de los circuitos socio-sexual y de recompensa de la rata hembra inducido por la experiencia sexual evaluado con imagenología por resonancia magnética por incrementos de manganeso.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto de las dosis de 8 y 16 mg/kg de $MnCl_2$ sobre la conducta (sexual, de ejercicio y locomotriz fina) de la rata hembra.
- Evaluar los circuitos socio-sexual y de recompensa que se activan por la conducta sexual mediante imágenes obtenidas por resonancia magnética por incrementos de manganeso.
- Analizar los circuitos cerebrales activados por CR y CNR en hembras en sesiones de cópula 1, 5 y 10 evaluado por resonancia magnética por incrementos de manganeso.

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Sujetos

Ratas hembra de la cepa Wistar con peso entre 200-250 g, sin experiencia sexual previa, fueron utilizadas para el proyecto.

Como estímulo para las pruebas de conducta sexual se utilizaron machos (cepa Wistar, 300 gr de peso) sexualmente expertos, los cuales tuvieron 5 sesiones de experiencia en cópula regulada por la hembra. Se consideró macho experto a todo aquel que durante cada sesión logre eyacular al menos una vez. La manipulación de los animales experimentales y estímulo se llevó a cabo entre las 8:00 am y 6:00 pm. Todos los animales estaban alojados en cuartos con un ciclo de luz-oscuridad invertido 12/12 con libre acceso a comida y agua. Los protocolos fueron aprobados por el comité de bioética del Instituto de Neurobiología.

3.1.1. Ovariectomía

Las ratas fueron ovariectomizadas (OVX) bilateralmente. Durante la semana de recuperación se monitoreo a las ratas, revisando que no se hayan retirado los puntos o se abrieran las suturas. Pasado el periodo de recuperación, las hembras recibieron inyecciones de estradiol y progesterona, como se describe posteriormente, para inducir receptividad.

3.2. Experimento 1

Evaluar el efecto de las dosis de 8 y 16 mg/kg de $MnCl_2$ sobre la conducta sexual, el ejercicio y la coordinación motriz de la rata hembra

Basados en estudios previos (O. Eschenko et al., 2010) utilizamos las dosis de 8 y 16 mg/kg de cloruro de manganeso ($MnCl_2$) (Manganeso(II) chloride, SIGMA-ALDRICH, Núm. de producto 244589, St. Louis) para evaluar sus efectos sobre la conducta sexual, la actividad en la rueda de ejercicio y la coordinación motora fina en el Rotarod. Los sujetos fueron asignados aleatoriamente a algunos de los tres grupos que se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Distribución de sujetos del Experimento 1. Determinación de dosis de $MnCl_2$ que no produce efectos conductuales inespecíficos, las hembras se dividieron aleatoriamente en 3 grupos.

Experimento 1			
Tratamiento	$NaCl_2$	8 mg/kg $MnCl_2$	16 mg/kg $MnCl_2$
Evaluación conductual	Cópula Rueda de ejercicio Rotarod	Cópula Rueda de ejercicio Rotarod	Cópula Rueda de ejercicio Rotarod
<i>n</i>	9	8	9

3.2.1. Pruebas de conducta sexual

Previo a cada sesión de conducta sexual, a las hembras se les administró 25 μ g de Benzoato de Estradiol (BE), 48 horas antes de la prueba y 1 mg de Progesterona (P) (Sigma®), 4 horas antes de la sesión para la inducción de receptividad. Para las pruebas de conducta sexual se utilizaron cajas de acrílico transparente (40x60x40 cm, Plexiglas®). Para hacer posible que la hembra regule los contactos copulatorios con el macho se colocó dentro de una caja de cópula con una división de acrílico con una pequeña apertura en medio (4x6 cm) que permite sólo el paso de la hembra entre compartimentos mientras el macho permanece en su compartimento por ser de mayor tamaño.



Figura 5. Cajas de evaluación conductual. Imagen representativa de las condiciones experimentales del grupo control y de conducta sexual.

Las pruebas tuvieron una duración de 30 minutos, donde se registraron los siguientes parámetros: número de montas (M), intromisiones (I) y eyaculaciones (E); latencias en segundos de monta (LM), intromisión (LI) y eyaculación (LE); se registró la lordosis (la dorsoflexión de la hembra sexualmente receptiva a la estimulación de un macho, medido con la siguiente escala: 0= sin lordosis, 1= lordosis media, 2= lordosis completa) de la hembra después de la estimulación del macho. Se calcularon los siguientes parámetros: la intensidad media de lordosis (IML), obtenida de la suma de los valores de lordosis entre el número de eventos copulatorios; el cociente de lordosis (CL), resultado de la división del total de lordosis entre el número de eventos copulatorios; el intervalo inter-intromisión (III, s), obtenido de dividir la LE entre el número de intromisiones. Además, se calculó el porcentaje de salidas después de un evento copulatorio dividiendo el número de salidas después del evento copulatorio (monta, intromisión o eyaculación) y multiplicándolo por 100, calculando de forma independiente la monta (%SM), la intromisión (%SI) y la eyaculación (%SE); y finalmente se obtuvo la latencia de regreso después de la monta (LRM, s), intromisión (LRI, s) y de eyaculación (LRE, s).

3.2.2. Rueda de ejercicio

Las hembras fueron entrenadas en la rueda de ejercicio en 3 diferentes sesiones. El equipo utilizado se compone por una caja transparente de policarbonato estándar (42x26x19 cm (h), Allentown Caging Equipment) y una rueda de ejercicio (modelo LE904 (76-0412), PANLAB) de acero inoxidable (36 cm de diámetro x 10 cm ancho) conectada a un Multicontador Programable (Modelo LE3806 (76-0243), PANLAB). La prueba tuvo una duración de 30 minutos y se registró el número de vueltas. Para obtener la distancia recorrida en metros (m) por sesión, se multiplicó el diámetro de la rueda por π (pi), obteniendo el perímetro de la rueda (1.13 m), que fue multiplicado por el número de vueltas. Los datos fueron exportados a una computadora mediante el programa Sedacom (SEDACOM Versión 2.0, Panlab-Harvard Apparatus®) para su análisis.

3.2.3. Rotarod

El Rotarod IITC (IITC Life Science, Serie 8), que consta de un cilindro (9.5 cm de diámetro), separado por 5 compartimentos de 9 cm, cada uno elevado a 30 cm de la cama del aparato. El entrenamiento en el Rotarod constó de 5 sesiones, donde la rata debe aprender a mantenerse en el cilindro (sesión 1) durante el tiempo de duración de la prueba (180 s) Después debe realizar la tarea usando incrementos de las revoluciones por minuto (rpm) (sesión de entrenamiento 2-3, 2-6 rpm; sesión de entrenamiento 4-5, 7-10 rpm, siendo 10 rpm la velocidad a utilizar en el experimento. El Rotarod fue programado en dos modalidades: Continua (Duración, 180 s; velocidad inicial, 10 revoluciones por minuto (rpm); velocidad final, 10 rpm; rampa, 0 s) y Rampa (Duración, 180 s; velocidad inicial, 10 rpm; velocidad final, 15 rpm; rampa, 120 s), en las cuales se registró la latencia de caída (s). Para evitar que una conducta pueda influir en el despliegue de la otra, se esperó 30 minutos entre las evaluaciones conductuales. Una vez concluidas las pruebas, las ratas fueron devueltas a su caja-habitación donde permanecieron sin manipulación hasta la siguiente sesión de experimento.

3.2.4. Preparación y administración de MnCl₂

Veinticuatro horas previas a las pruebas de conducta sexual, rueda de ejercicio y Rotarod de la sesión 1, 5 y 10 se administró el tratamiento correspondiente a cada grupo (16 mg/kg, 8 mg/kg o Salina). El MnCl₂ se preparó con solución salina al 9%, utilizándose el mismo día. Las hembras fueron pesadas, para determinar la solución a administrar por sujeto, en un volumen de 10 ml/kg vía s.c.

3.2.5. Procedimiento Conductual

Las pruebas conductuales se realizaron una vez por semana. Primero la prueba de conducta sexual, seguida de la rueda de ejercicio y después la coordinación motora (Rotarod). Para evitar que una conducta pueda influir en el despliegue de la otra, se espaciaron 30 minutos. Una vez concluidas las pruebas, las ratas fueron devueltas a su caja-habitación donde permanecieron sin manipulación hasta la siguiente sesión de experimento. Se realizaron 10 sesiones con un intervalo de 7 días por sesión. El MnCl₂ se administró vía s.c. en las sesiones 1, 5 y 10. El intervalo entre administraciones permitió observar cambios conductuales resultado de la administración de cloruro de manganeso, así como identificar sus posibles efectos a largo plazo, evitando efectos adversos por la acumulación. En la Figura 4 se presenta la línea temporal para el Experimento 1.

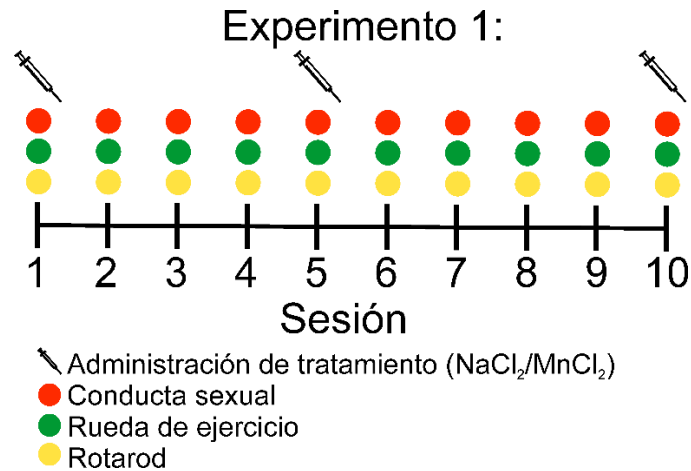


Figura 6. Esquema temporal del Experimento 1. El MnCl₂ se administró 24 horas previas a la sesión de conducta sexual en las semanas 1, 5 y 10, seguida por las evaluaciones conductuales en la rueda de ejercicio y Rotarod. Las sesiones restantes se realizaron sin administración de MnCl₂.

3.3. Experimento 2

Determinar la dosis de cloruro de manganeso que permita obtener la mejor señal posible

Una vez que en el Experimento 1 demostramos que las dosis de MnCl₂ no producen alteraciones conductuales que puedan interferir con la interpretación de los resultados, en el Experimento 2 comparamos la intensidad de señal obtenida de las mismas dosis de MnCl₂ en estructuras cerebrales durante la prueba de conducta sexual.

Tabla 3. Distribución de sujetos del Experimento 2. Hembras ovariectomizadas fueron divididas al azar en 4 grupos para evaluar la dosis de MnCl₂ que produzca señal en el resonador con intensidad óptima.

Experimento 2				
Tratamiento	16 mg/kg MnCl ₂	8 mg/kg MnCl ₂	16 mg/kg MnCl ₂	8 mg/kg MnCl ₂
Tarea	Control	Control	Cópula	Cópula
Secuencia	T1-3D FLASH	T1-3D FLASH	T1-3D FLASH	T1-3D FLASH
<i>n</i>	13	13	13	13

Todos los grupos recibieron el tratamiento hormonal (BE, 25 µg; P 1 mg) y de MnCl₂ (8 y 16 mg/kg, respectivamente) en las sesiones 1, 5 y 10. Los controles no copularon, solamente permanecieron 30 minutos en la caja de conducta sexual con aserrín limpio. De esta manera podremos identificar diferencias de acumulación del manganeso respecto a los grupos experimentales.

3.3.1. Preparación y administración de MnCl₂

Se preparó y administró como se describió en el Experimento 1.

3.3.2. Prueba de conducta sexual

Se realizó bajo las mismas condiciones descritas en el Experimento 1.

3.3.3. Adquisición de imágenes por resonancia magnética

Una vez concluida las pruebas de conducta sexual en las sesiones 1, 5 y 10, los sujetos se llevaron al Laboratorio Nacional de Imagenología por Resonancia Magnética (LANIREM), al resonador para especies pequeñas de 7 Teslas (BioScan Bruker® PharmaScan). Los sujetos fueron anestesiados en una cámara de inducción con isoflurano (Sofloran® Vet) al 4%, una vez sedados, la rata se montó en la plataforma del resonador y se mantuvo la anestesia del 1.5-2%, regulando el porcentaje de la anestesia de acuerdo a la frecuencia respiratoria que fue monitoreada para mantener niveles normales (40-70 respiraciones por minuto); se colocaron sensores de temperatura (vía rectal) para monitorear la temperatura del animal durante el escaneo, manteniendo la temperatura del sujeto (37 °C) utilizando una bomba de agua que mantiene en circulación agua caliente y que cuenta con un sistema de mangueras que pasan por debajo de la plataforma donde se coloca el animal. Se utilizó la siguiente secuencia: T1-3D FLASH, Tiempo de eco: 8 ms;

Tiempo de repetición: 50 ms; promedio: 2; repeticiones; grosor de rebanada: 16 mm; tamaño de imagen: 150x160x80; campo de visión: 30x32x16 mm; ángulo de inclinación: 20°; 23 min, 28 s. Terminado el escaneo, se colocó al animal en una caja con aserrín limpio y esperamos a que se recuperará completamente de la anestesia para regresarla a su caja.

3.3.4. Análisis de imágenes

Una vez realizados los escaneos de las sesiones 1, 5 y 10, los archivos pasaron por un pre-procesamiento, preparando los archivos para el análisis final (Figura 7). El primer paso es cambiar las dimensiones del vóxel, para poder utilizar el software FSL (FSL, FMRIB Library v5.0). Después, se creó un cerebro de referencia (*Template*) con las imágenes de la sesión 1 de cada grupo (Control, 8 y 16 mg/kg) para tener un cerebro promedio de los sujetos utilizados en el experimento.

Una vez obtenido el cerebro de referencia, se hace un corregistro de las imágenes de los sujetos con el cerebro de referencia, corrigiendo las diferencias de posición espacial de todas las imágenes, ubicándose en las mismas coordenadas espaciales. Una vez alineadas las imágenes, se dibujaron las máscaras de las áreas de interés, o *ROIs* (*ROI*, del inglés *Region Of Interest*) a analizar, basándose en un atlas anatómico de rata (Paxinos & Watson, 2005). Las áreas seleccionadas fueron: el bulbo olfatorio (BO), la amígdala (AMG), el área preóptica medial (APOM), el hipotálamo ventromedial (HVM), y el núcleo de la cama de la estría terminal (NCET). Estas áreas corresponden al circuito socio-sexual. También seleccionamos el núcleo accumbens (NAcc), el hipocampo (Hip), el cuerpo estriado (CE) y el área tegmental ventral (ATV) como parte del circuito de recompensa. Como regiones control se hicieron máscaras de la glándula pituitaria (Pit), la corteza retrosplenial (CoRet), corteza gustativa (CoGus) y corteza visual (CoVis). La glándula Harderiana (GH) fue utilizada para obtener la intensidad de señal para normalizar los datos de intensidad de señal (Treuting & Jr., 2012).

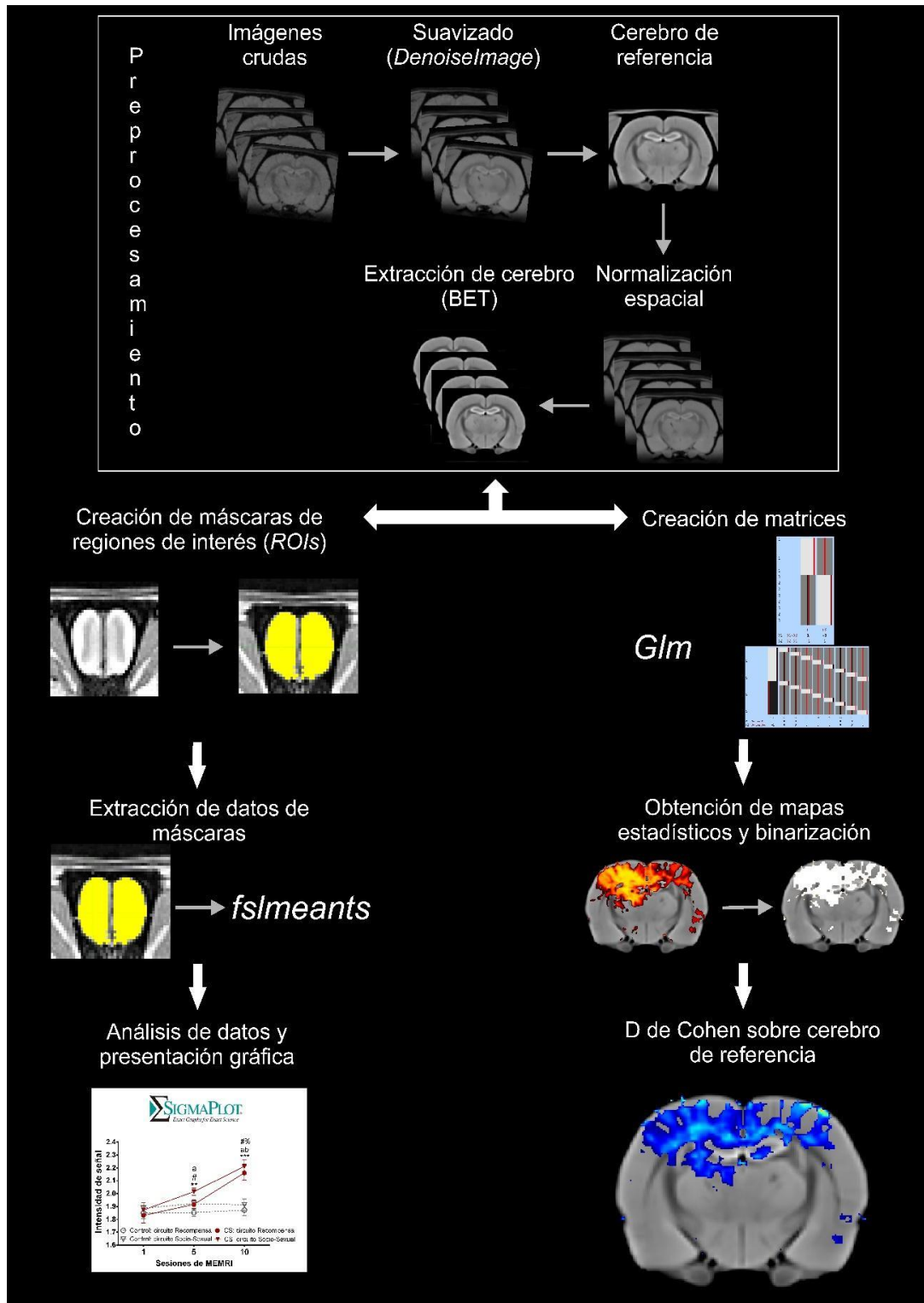


Figura 7. Representación del proceso de análisis de imágenes de resonancia magnética. Los primeros pasos son el pre-procesamiento en el que se lleva a las imágenes a un espacio estándar, mientras que los pasos finales se centran en la comparación y obtención de resultados. Bet, de “*brain extraction tool*”; ROI, “*región of interest*”; Glm, “*general lineal model*”; fslmeants, herramienta de *FSL* que extrae valores de intensidad de vóxeles.

Se utilizaron las máscaras de las *ROIs* para extraer los datos (valores de intensidad de señal de los vóxeles), exportándose a una base de datos para la normalización. Los datos de las *ROIs* fueron normalizados dividiendo el valor de la intensidad de señal de la *ROIs* entre la región de referencia (*ROI/RF*). Después del normalizado de intensidad de señal, se aplica el suavizado espacial (*DenoiseImage*), que tiene como objetivo reducir el ruido aleatorio en los vóxeles y homogeneizar la señal de las imágenes. Finalizado este paso, los datos fueron cargados a un programa estadístico para su análisis.

3.3.5. Análisis por vóxel

Las imágenes normalizadas y con eliminación de ruido fueron ordenadas de acuerdo con su grupo, donde se comparan los grupos control con los experimentales por sesión (Control vs Experimental en la sesión 1, sesión 5 y sesión 10), así como comparar los grupos contra sus propias sesiones (Experimental sesión 1 vs Experimental sesión 10). Se crearon matrices para las comparaciones correspondientes usando la paquetería *Glm* (de *General Linear Model*) del software FSL (Figura 7). Una vez obtenidas las imágenes ordenadas y las matrices de comparación, se usó la paquetería *randomise* (FSL) para ejecutar el análisis por vóxel, realizando permutaciones para controlar los errores por múltiples comparaciones, corrigiendo a nivel de conjuntos contiguos de vóxeles (clúster de vóxeles). Al final del análisis, se obtienen mapas estadísticos de las comparaciones, donde se establece el valor de $p < 0.05$ (corregida) para delimitar los vóxeles con significancia estadística. Finalmente se transforman los mapas estadísticos de valores p a valores t , y se sobreponen al cerebro de referencia (*Template*) para obtener las imágenes de las regiones activas.

3.3.6. D de Cohen

Una vez obtenidos los mapas estadísticos se aplicó el análisis de la D de Cohen. La D de Cohen se centra en el tamaño del efecto, que es definido como “la diferencia de magnitud entre grupos” (Sullivan & Feinn, 2012) y no sólo depender de los valores p . Para este análisis se transformaron los mapas estadísticos a máscaras binarias, los cuales serán *rois* de los vóxeles estadísticamente significativos (Figura 7). Después se obtiene una imagen de la media y la desviación estándar de cada grupo usando la herramienta *fslmaths*. Una vez obtenidos estos datos, se resta la media del grupo control a la media del grupo experimental y se divide entre la desviación estándar del grupo correspondiente. El resultado es clasificado en tamaño de efecto pequeño ($d= 0.2$), mediano ($d= 0.5$), grande (≥ 0.8) y muy grande (≥ 1.3) (Sullivan & Feinn, 2012). Con esta clasificación, se utilizará el umbral de 0.8 en la imagen resultante para representar solamente los tamaños grandes.

3.3.7. Procedimiento conductual

Las pruebas de conducta sexual se realizaron una vez por semana. Al finalizar las pruebas, las ratas fueron devueltas a su caja-habitación donde permanecieron sin manipulación hasta la siguiente sesión. Se realizaron 10 sesiones con un intervalo de 7 días entre sesiones. El cloruro de manganeso se administró vía s.c. en las sesiones 1, 5 y 10. En la Figura 4 se representa la línea temporal para el Experimento 2.

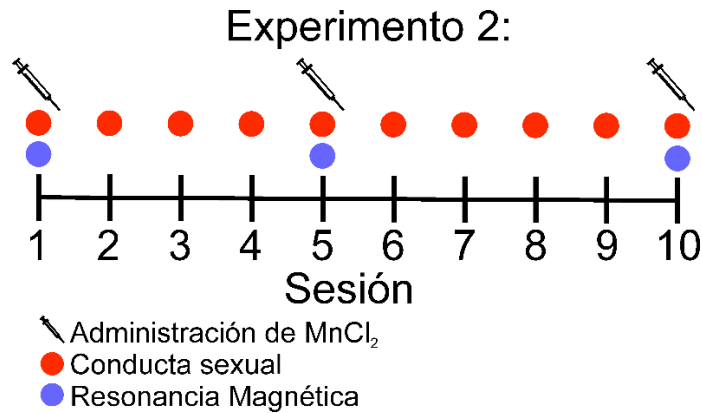


Figura 8. Esquema temporal del Experimento 2. Se muestra que las hembras copularon una vez por semana regulando los contactos copulatorios. El $MnCl_2$ se administró 24 horas previas a la sesión de conducta sexual en las semanas 1, 5 y 10, seguida por el escaneo de los sujetos. En las semanas 2-4 y 6-9 los sujetos solo copularon sin ser escaneados.

3.4. Experimento 3

Comparar por MEMRI los circuitos cerebrales que se activan en hembras que regulan y en aquellas que no regulan los contactos copulatorios

Una vez determinado que la dosis de 16 mg/kg de cloruro de manganeso no tiene efectos en el desempeño motor y sexual de las ratas hembra a lo largo de 10 semanas; y que la intensidad de señal obtenida en imágenes de resonancia magnética, 24 horas después de la administración de cloruro de manganeso, es adecuada para estudios longitudinales de conducta sexual, se inició el Experimento 3. Éste consistió en comparar por MEMRI los circuitos neuronales que se activan cuando las hembras regulan y cuando no regulan los contactos copulatorios.

Además del grupo control que no desplegó la conducta sexual agregamos un grupo que tampoco copuló pero que una vez a la semana fue expuesto a olores de machos sexualmente activos para descartar un posible efecto de las feromonas o claves químiosensoriales sexualmente relevantes (Tabla 4). El orden de los experimentos fue llevado a cabo como en los Experimentos 1 y 2 (Figura 6).

Tabla 4. Distribución de los sujetos del Experimento 3. Un grupo de hembras ovariectomizadas fueron divididas al azar en 4 grupos para evaluar la intensidad de señal asociada al tratamiento experimental.

Experimento 3				
Grupo	Control	Exposición	Cópula no regulada	Cópula regulada
Tarea	60 min. en la caja	60 min. en la caja con exposición a macho	60 min. de cópula no regulada	60 min. de cópula regulada
Secuencia	T1-3DFLASH	T1-3DFLASH	T1-3DFLASH	T1-3DFLASH
<i>n</i>	9	10	11	11

3.4.1. Preparación y administración de MnCl₂

Veinticuatro horas previas a las pruebas de conducta sexual (Exposición, Regulada y No Regulada por la hembra) así como en los sujetos control, se administró el tratamiento de 16 mg/kg de MnCl₂. El procedimiento de preparación y administración fue el mismo que el descrito en los Experimentos 1 y 2.

3.4.2. Prueba de exposición

Hembras sexualmente receptivas fueron expuestas a un macho sexualmente experto durante 1 hora, una vez a la semana. La caja donde se realizó la prueba tiene las mismas características que las cajas de cópula, con la excepción que tienen una división que separa la caja en dos compartimentos, donde la hembra sólo recibió contacto auditivo, olfativo y visual por parte del macho.

3.4.3. Prueba de conducta sexual

Cópula regulada por la hembra. La prueba se realizó bajo las mismas condiciones descritas en los Experimentos 1 y 2, con la excepción del incremento del tiempo de la prueba, que fue de 60 minutos.

Cópula no regulada por la hembra. La prueba se realizó en una caja con las mismas características de las pruebas de conducta sexual, pero en este caso sin la división central que separa al macho y a la hembra, por lo que el macho se encuentra libre para controlar los contactos copulatorios. La prueba tuvo una duración de 60 minutos.

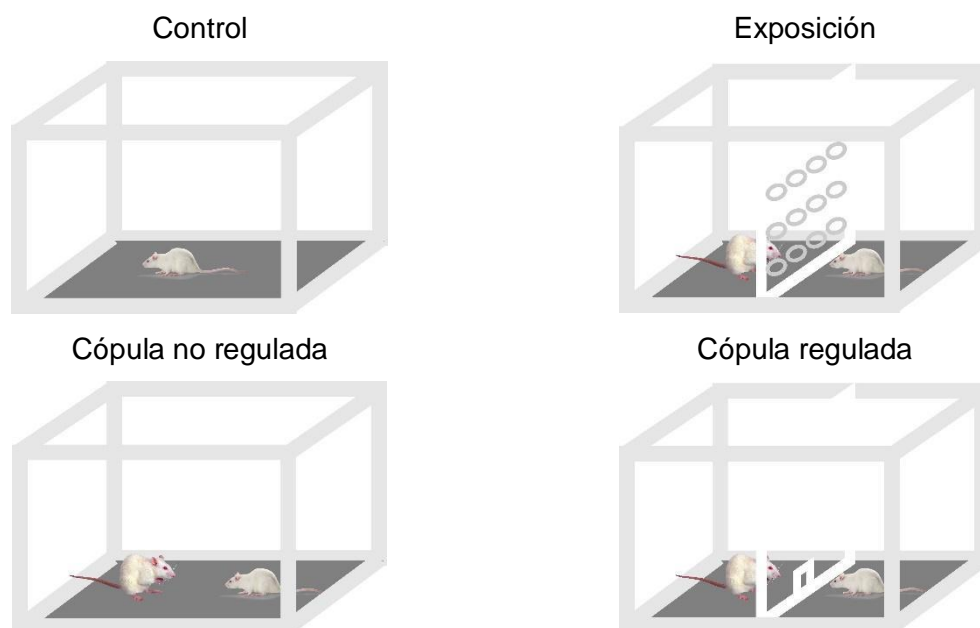


Figura 9. Imagen representativa de las condiciones experimentales de los grupos del Experimento 3.

3.4.4. Adquisición y análisis de imágenes por resonancia magnética

Tanto el proceso de adquisición y análisis de las imágenes T1-3DFLASH se realizaron como fue descrito en el Experimento 2.

3.4.5. Procedimiento conductual

Las pruebas conductuales se realizaron una sesión por semana. Al finalizar las pruebas, las ratas fueron devueltas a su caja-habitación donde permanecieron sin

manipulación hasta la siguiente sesión. Se realizaron 10 sesiones con un intervalo de 7 días por sesión. El $MnCl_2$ se administró vía s.c. en las sesiones 1, 5 y 10. En la Figura 6 se presenta la línea temporal para el Experimento 3.

A continuación, se presenta un esquema de la línea temporal que siguieron las pruebas del Experimento 3.



Figura 10. Esquema temporal del Experimento 3. Se muestra las semanas que se administró $MnCl_2$ 24 horas previas a las pruebas conductuales, seguida por el escaneo de los sujetos.

3.5. Análisis estadístico

Los resultados de los Experimentos 1, 2 y 3 fueron analizados con el programa Sigma Plot versión 11.0. Los resultados conductuales, de intensidad de señal y sensibles a difusión de las imágenes de resonancia magnética fueron analizados con la prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov y homogeneidad de varianza. Debido a que los datos no pasaron las pruebas de normalidad, se utilizaron pruebas estadísticas no paramétricas.

Las comparaciones estadísticas para las pruebas conductuales del Experimento 1 (conducta sexual, rueda de ejercicio y coordinación motriz fina) se utilizó la prueba Friedman para medidas repetidas para las comparaciones intragrupalas a lo largo de las sesiones, con la prueba Tukey como *post hoc*; para las comparaciones intergrupales se aplicó la prueba de Kruskal Wallis (KW), usando la U de Mann-Whitney (UMW) como *post hoc* en caso de diferencias significativas.

Las comparaciones de conducta y de imágenes de MEMRI del Experimento 2 para conducta se comparó los grupos de dosis 8 y 16 mg/kg de cloruro de manganeso usando la prueba U de Mann-Whitney; los resultados de las imágenes de MEMRI fueron analizados por dosis, comparando las imágenes de los grupos control y experimental de 8 mg/kg y 16 mg/kg de forma independiente. Los datos de estas regiones fueron agrupados en sus respectivos circuitos y fueron analizados de tal manera, comparando los circuitos de respuesta socio-sexual y recompensa del grupo control contra el grupo de conducta sexual de 8 y 16 mg/kg. Para las comparaciones de los resultados de imágenes de resonancia a través del tiempo se aplicó la prueba Friedmann para medidas repetidas, con la prueba Tukey como *post hoc*.

En el Experimento 3 se comparó la conducta de los dos grupos de hembras que copularon (regulada y no regulada por la hembra), exceptuando los parámetros de porcentaje de salida y latencia de regreso después de un evento copulatorio, usando

la U de Mann-Whitney; los resultados de MEMRI se compararon usando la prueba Kruskal Wallis, usando la U de Mann Whitney como *post hoc*. En todas las pruebas se tomó el valor de significancia de $p < 0.05$. Para las comparaciones a través del tiempo de los resultados de conducta sexual y de imágenes de resonancia se aplicó la prueba Friedman para medidas repetidas, con la prueba Tukey como *pos-hoc*.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados de los experimentos.

4.1. Experimento 1

En el Experimento 1 se buscó evaluar el efecto de las dosis de 8 y 16 mg/kg de $MnCl_2$ en la conducta sexual, locomotora voluntaria y locomotora forzada de ratas hembra.

4.1.1. Conducta sexual

A continuación, se presentan los resultados de los parámetros de conducta sexual del Experimento 1 (Tabla 5). Se presentan las sesiones 1, 5 y 10 debido a que son las sesiones donde se administró el $MnCl_2$. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros de conducta sexual cuando se comparan los grupos entre sí o entre las sesiones.

Tabla 5. Parámetros de las pruebas de conducta sexual del Experimento 1. Se muestran las sesiones 1, 5 y 10 de los grupos Control (salina), 8 y 16 mg/kg de MnCl₂. Los datos son presentados como media ± error estándar de la media. III, intervalo inter-intromisión; IML, intensidad media de lordosis; CL, cociente de lordosis.

Grupos Sesiones	Control (n=9)			8 mg/kg (n=8)			16 mg/kg (n=9)		
	1	5	10	1	5	10	1	5	10
Montas	12.67 ± 4.2	4.4 ± 1.4	6.5 ± 2	15.6 ± 6.7	5.9 ± 1.7	11 ± 5.3	10.3 ± 4.2	10.8 ± 2.7	2.8 ± 1
Intromisiones	15.1 ± 1.5	11.7 ± 2.6	10.3 ± 2.7	16.4 ± 2.6	14.2 ± 2.5	4.5 ± 1.5	13.7 ± 2.4	14.2 ± 2.6	12.2 ± 5.5
Eyacuaciones	1.3 ± 0.4	1.4 ± 0.5	1 ± 0.4	1.5 ± 0.5	1.5 ± 0.4	0.5 ± 0.3	0.8 ± 0.3	1.4 ± 0.3	1.7 ± 0.4
Latencias (seg)									
Montas	69.8 ± 22.8	239.4 ± 146	156.2 ± 64.3	55.9 ± 26.7	92 ± 41.7	304 ± 121.4	114 ± 56.6	264 ± 94.8	28.78 ± 10.7
Intromisiones	150.1 ± 55.8	291.2 ± 175	239.5 ± 103	252.4 ± 113	278 ± 137.7	214.2 ± 100	187 ± 56.6	303 ± 97.6	78.9 ± 31.4
Eyacuaciones	390 ± 123.5	302.1 ± 110	505 ± 199.6	369.7 ± 123	530 ± 155.3	454.7 ± 223	426 ± 170	1029 ± 222	540 ± 151.5
III (seg)	39.4 ± 12.1	28.9 ± 9.8	36.2 ± 12.1	30.9 ± 11.8	44.9 ± 13.6	29.4 ± 14.8	26.2 ± 11	71.7 ± 17	43.6 ± 10.8
IML	2 ± 0	1.8 ± 0.2	1.5 ± 0.3	1.97 ± 0.01	2 ± 0	1.5 ± 0.3	1.7 ± 0.2	1.99 ± 0	1.5 ± 0.3
CL	100 ± 0	88.9 ± 11.1	77.8 ± 14.7	100 ± 0	100 ± 0	75 ± 16.4	88.9 ± 11	100 ± 0	77.8 ± 14.8
% de salidas									
Montas	18 ± 6.5	23.1 ± 12.9	9.9 ± 5.8	22.6 ± 12	34 ± 12.8	7.6 ± 4.6	10.4 ± 6.5	16.3 ± 3.9	28.7 ± 12.8
Intromisiones	71.5 ± 7.8	71.9 ± 10.5	70.6 ± 13.8	71.3 ± 7.5	81.7 ± 4.3	51.6 ± 15.7	45.2 ± 10	83.6 ± 3.3	66.6 ± 13.6
Eyacuaciones	66.6 ± 16.6	55.5 ± 17.5	55.5 ± 17.6	62.5 ± 18.3	75 ± 16.4	37.5 ± 18.3	44.4 ± 17.6	88.9 ± 11	77.8 ± 14.7
Latencia de regreso (seg)									
Montas	9.6 ± 4.7	7.4 ± 3.9	4.7 ± 2.4	9.9 ± 3.7	9.9 ± 3.7	7.5 ± 3.7	11.1 ± 4.2	11.1 ± 4.2	5.6 ± 2.6
Intromisiones	39.6 ± 3.9	29.2 ± 5.4	42.2 ± 17.3	46 ± 12.3	46 ± 12.3	24.3 ± 8.3	42 ± 7.8	42 ± 7.8	27.9 ± 6.2
Eyacuaciones	63.3 ± 21	48 ± 22.7	73.2 ± 33.6	69.6 ± 28	69.6 ± 28	45 ± 23.4	58.9 ± 37	58.8 ± 37	118 ± 41.8

4.1.2. Rueda de ejercicio

Se encontraron diferencias significativas en la sesión 6 y 8 (Kruskal Wallis, sesión 6, $H=5.985$, $df=2$, $p<0.05$; sesión 8, $H=6.14$, $df=2$, $p=0.046$). Los animales con la dosis de 16 mg/kg recorrieron mayor distancia comparados con el grupo control (sesión 6, $UMW=11$, $T=89$, $p=0.028$; sesión 8, $UMW=7$, $T=93$, $p=0.007$) (Figura 11). En la sesión 9, se encontraron diferencias significativas (KW, $H=10.905$, $df=2$, $p=0.004$) en los sujetos tratados con 8 mg/kg ($UMW=13$, $T=49$, $p<0.05$) y 16mg/kg ($UMW=2$, $T=38$, $p=<0.001$) comparados con el grupo control. Las comparaciones de la prueba de Friedman para medidas repetidas mostraron diferencias del grupo con 8 mg/kg ($X^2=17.344$, $df=9$, $p=0.044$) en la sesión 9 comparada con la sesión 5 ($q=4.613$); para el grupo de 16 mg/kg ($X^2=26.55$, $df=9$, $p=0.002$) en la sesión 7 ($q=4.554$) y 9 ($q=4.554$) comparadas con la sesión 1. No se encontraron diferencias significativas en el grupo control a lo largo de las 10 sesiones ($X^2=9.335$, $df=9$, $p=0.407$).

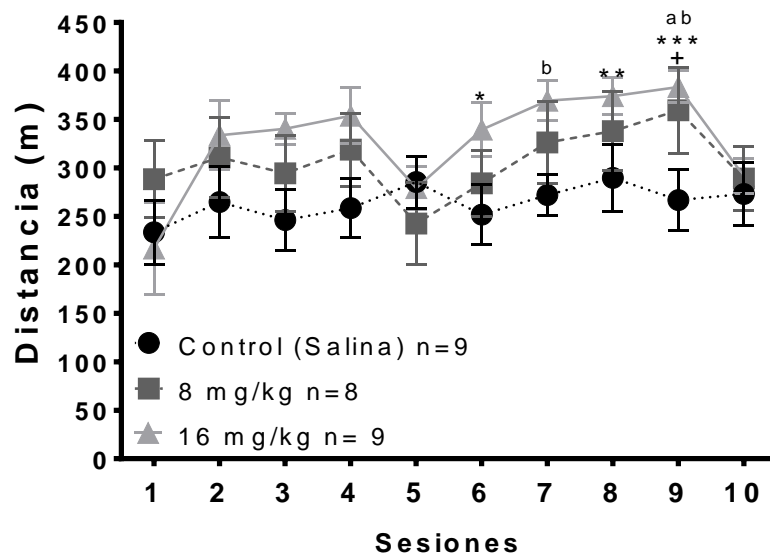


Figura 11. Resultados de la rueda de ejercicio. Distancia en metros recorrida durante las 10 sesiones del experimento. Los datos se expresan como media \pm error estándar.
+ Diferencia entre grupo de 8 mg/kg y grupo control, $p<0.05$.
* Diferencia entre grupo de 16 mg/kg y grupo control, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$.
a=Diferencia en el grupo de 8 mg/kg con la sesión 5.
b=Diferencia en el grupo de 16 mg/kg con la sesión 1.

4.1.3. Latencia de caída en el Rotarod

Después de la rueda de ejercicio, los sujetos fueron llevados al Rotarod, donde fueron evaluados en dos modalidades, velocidad constante (10 rpm) y en rampa (10-15 rpm), con duración total de 3 minutos por modalidad. Cada sesión terminaba cuando el sujeto caía del rodillo, registrando la latencia de caída. Los resultados de la prueba de 10 rpm (Figura 12) ($X^2=41.820$, $gl=29$, $p<0.058$) y rampa (Figura 13) ($X^2=34.456$, $gl=29$, $p=0.223$) mostraron que no existen diferencias significativas entre los grupos, las sesiones y su interacción.

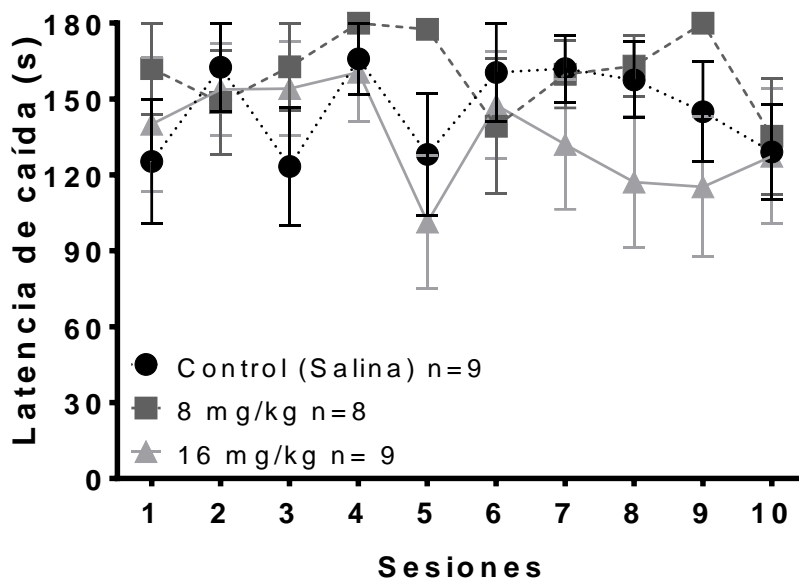


Figura 12. Resultados de Rotarod 10 rpm. Latencia de caída en la modalidad de 10 rpm durante las 10 sesiones del Experimento 1. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos o las sesiones. Los datos expresados como media \pm error estándar.

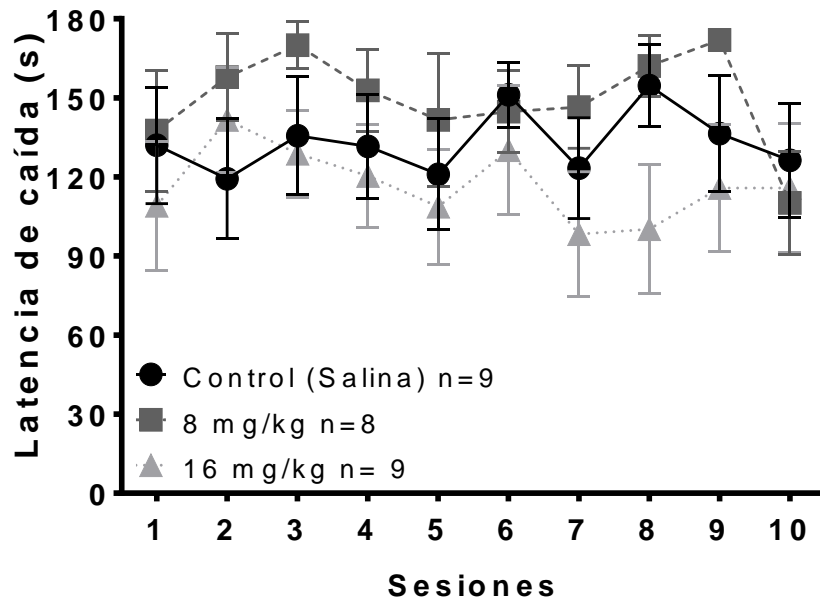


Figura 13. Resultados de Rotarod 10-15 rpm. Latencia de caída en la modalidad de 10-15 rpm durante las 10 sesiones de Experimento 1. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos o las sesiones. Los datos expresados como media \pm error estándar.

4.2. Experimento 2

En el Experimento 2 se buscaron evaluar los efectos en la intensidad de señal de las dosis de 8 y 16 mg/kg de $MnCl_2$ en imágenes de resonancia magnética de hembras que copularon comparadas con hembras control. Similar al Experimento 1, se administró el tratamiento en las semanas 1, 5 y 10, 24 horas previas a la evaluación conductual.

4.2.1. Conducta sexual

De la misma manera que en el Experimento 1, se analizaron los parámetros de conducta sexual de la sesión 1, 5 y 10 (Tabla 8), donde las hembras fueron escaneadas.

Se encontraron diferencias significativas en la latencia de monta en la sesión 10 entre los grupos (UMW=38, $T=129$, $p=0.018$), teniendo el grupo de 16 mg/kg una mayor latencia de monta recibida comparada con el grupo de 8 mg/kg. El número de eyaculaciones recibidas fue mayor en la sesión 5 (Prueba de Friedman, $X^2=8.977$, $df=2$, $p=0.011$) comparada con la sesión 1 ($q=3.467$) en el grupo de 8 mg/kg. La latencia de monta se redujo en la sesión 10 en comparación con la sesión 1 en el mismo grupo (Prueba de Friedman, $X^2=6.157$, $df=2$, $p=0.046$; Tukey post hoc, $q=3.467$). Se presentó un incremento en el porcentaje de salidas después de una intromisión en ambos grupos en las sesiones 5 y 10 comparadas con su respectiva sesión 1: 8 mg/kg, $X^2=12.118$, $df=2$, $p=0.002$, sesión 5 vs sesión 1 (Tukey post hoc, $q=3.744$), sesión 10 vs sesión 1 (Tukey post hoc, $q=4.576$); 16 mg/kg ($X^2=7.385$, $df=2$, $p=0.025$), sesión 5 vs sesión 1 (Tukey post hoc, $q=3.328$) y en la sesión 10 vs sesión 1 (Tukey post hoc, $q=3.328$).

Tabla 6. Resultados de las pruebas de conducta sexual del Experimento 2. Se muestran las sesiones 1, 5 y 10, en las que se administró cloruro de manganeso y fueron escaneados. Los datos son presentados como media \pm error estándar.

Grupo Sesión	8 mg/kg (n=13)			16 mg/kg (n=13)		
	1	5	10	1	5	10
# de evento						
Monta	13.30 \pm 3.57	12.38 \pm 2.72	4.46 \pm 1.46	10.85 \pm 2.71	10.35 \pm 2.41	6.00 \pm 1.71
Intromisión	12.00 \pm 1.61	15.84 \pm 2.09	15.69 \pm 1.96	10.28 \pm 1.95	14.92 \pm 2.09	13.00 \pm 2.19
Eyacuación	0.76 \pm 0.25	1.8 \pm 0.25^a	1.69 \pm 0.26	0.57 \pm 0.20	1.42 \pm 0.27	1.57 \pm 0.30
Latencia (s)						
Monta	79.7 \pm 25.64	59. \pm 25.73	13.38 \pm 4^a	114.5 \pm 27.3	288 \pm 122.9	173.6 \pm 89.3*
Intromisión	129.2 \pm 37.1	98.84 \pm 56	26.69 \pm 11	172.6 \pm 46.5	250 \pm 78.25	204.92 \pm 88.4
Eyacuación	376.7 \pm 125	630 \pm 134.8	546.5 \pm 128.7	411.8 \pm 149	708.8 \pm 158	587.8 \pm 138.4
III (s)	44.8 \pm 18	57.1 \pm 9.95	53.6 \pm 13.18	40.88 \pm 15.6	48.89 \pm 9.41	53.32 \pm 13.31
IML	1.84 \pm 0.15	1.82 \pm 0.15	1.83 \pm 0.15	1.71 \pm 0.19	2.00 \pm 00	1.85 \pm 0.14
CL	92.3 \pm 7.69	92.3 \pm 7.69	92.30 \pm 7.69	85.71 \pm 9.70	100.00 \pm 00	92.85 \pm 7.14
% de salida						
Monta	9.89 \pm 5.02	8.54 \pm 5.77	15.71 \pm 6.74	9.77 \pm 4.36	12.55 \pm 5.33	11.22 \pm 5.60
Intromisión	33.91 \pm 7.09	69.14 \pm 7^a	76.5 \pm 7.15^a	28.05 \pm 8.34	70.4 \pm 8.75^a	74.69 \pm 7.14^a
Eyacuación	53.8 \pm 14.39	92.30 \pm 7.69	92.30 \pm 7.69	42.85 \pm 13.72	78.57 \pm 11.38	78.57 \pm 11.38
Latencia de regreso (s)						
Monta	23.8 \pm 8.87	3.76 \pm 2.05	3.59 \pm 1.96	14.67 \pm 6.54	4.88 \pm 2.06	2.42 \pm 1.27
Intromisión	68.53 \pm 21	34.86 \pm 9.6	38.8 \pm 15.46	41.5 \pm 15.36	34.70 \pm 5.91	44.02 \pm 17.6
Eyacuación	23 \pm 11.46	128 \pm 42.4	102.8 \pm 25.7	31.8 \pm 19.57	94.71 \pm 21.6	148.07 \pm 66.2

^a=Diferencias significativas intergrupales con la sesión 1

*=Diferencia con el grupo 16 mg/kg, p=<0.05

4.2.2. MEMRI

Después de la prueba de conducta sexual, las hembras fueron llevadas al Laboratorio Nacional de Imagenología por Resonancia Magnética (LANIREM) para ser escaneadas en el resonador Bruker de 7T. Una vez obtenidas, las imágenes fueron analizadas usando máscaras de regiones de interés (Figura 14).

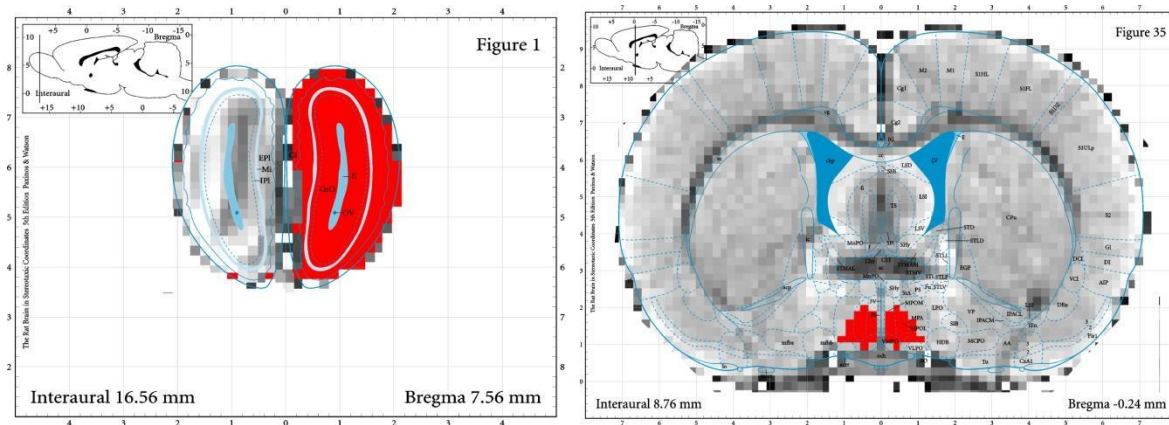


Figura 14. Ejemplos de las máscaras creadas. Regiones de interés definidas usando un atlas anatómico de rata como referencia. De izquierda a derecha, el bulbo olfatorio y el área preóptica medial.

4.2.2.1. Bulbo Olfatorio

Un incremento de intensidad de señal se observó en la sesión 5 (Figura 14) en la sesión 5 (KW, $H=8.877$, $df=3$, $p=0.031$) en el grupo de conducta sexual (CS) 8 mg/kg comparado con su propio control (UMW=36.5, $T=127.5$, $p=0.015$). En la sesión 10 (Figura 15) se encontró un incremento de la intensidad de señal (KW, $H=13.702$, $df=3$, $p=0.003$) en el grupo de 8 mg/kg (UMW=42.5, $T=133.5$, $p=0.033$) y en el grupo 16 mg/kg (Figura 16) (UMW=27, $T=118$, $p=0.003$), comparados con sus respectivos controles. Diferencias significativas fueron encontradas a través de las sesiones (Figura 16) en el grupo de CS 16 mg/kg ($X^2=10.308$, $df=2$, $p=0.006$). La prueba Tukey reveló que la intensidad de señal en la sesión 10 era mayor que en la sesión 1 (Tukey *post hoc*, $q=4.438$).

4.2.2.2. Núcleo de la cama de la estría terminal

Resultados de la prueba Kruskal Wallis mostraron un incremento de la intensidad de señal (Figura 15) en la sesión 5 ($H=15.821$, $df=3$, $p=0.001$) en el grupo CS 8 mg/kg en comparación con su control ($UMW=22$, $T=113$, $p=0.001$). En la sesión 10 se encontraron resultados similares, incrementando significativamente la señal (KW, $H=12.463$, $df=3$, $p=0.006$) en el grupo CS comparado con su control ($UMW=38.5$, $T=129.5$, $p=0.02$). Mientras tanto el grupo de CS 16 mg/kg (Figura 16) incrementó su intensidad de señal en la sesión 10 comparada con la sesión 1 (Prueba Friedman, $X^2=10.308$, $df=2$, $p=0.006$, Tukey *post hoc*, $q=4.438$).

4.2.2.3. Amígdala

Diferencias significativas en la intensidad de señal fueron encontradas en la sesión 5 (KW, $H=10.357$, $df=3$, $p=0.016$) en el grupo CS 8 mg/kg (Figura 15) comparado con su control ($UMW=45$, $T=136$, $p=0.045$). En el grupo de CS de 16 mg/kg (Figura 16) se encontró un incremento significativo en la intensidad de señal comparado con su control ($UMW=40$, $T=131$, $p=0.024$) en la sesión 10. Además, la intensidad de señal de este grupo fue (Figura 16) mayor significativamente ($X^2=12.423$, $df=2$, $p=0.002$) comparado con su sesión 5 (Tukey *post hoc*, $q=3.328$) y su sesión 1 (Tukey *post hoc*, $q=4.992$).

4.2.2.4. Área preóptica medial

Resultados similares respecto al grupo de CS 8 mg/kg (Figura 15) fueron encontrados en el APOM. En la sesión 5, diferencias en la intensidad de señal fueron encontradas (KW, $H=14.751$, $df=3$, $p=0.002$) comparados con su control ($UMW=25$, $T=116$, $p=0.002$). En la sesión 10, diferencias significativas fueron encontradas en ambos grupos (KW, $H=13.049$, $df=3$, $p=0.005$), comparados con

sus respectivos controles (CS 8 mg/kg, UMW=37.5, T=128.5, p=0.017; CS 16 mg/kg, UMW=50, T=131, p=0.024). De igual manera, la intensidad de señal del grupo CS 16 mg/kg (Figura 16) fue significativamente diferente comparada con su sesión 1 ($X^2=11.231$, df=2, p=0.004, Tukey *post hoc*, q=4.715).

4.2.2.5. Hipotálamo ventromedial

Consistente con los resultados previos, diferencias en la intensidad de señal fueron encontradas en la sesión 5 (KW, H=10.936, df=3, p=0.012) en el grupo CS en la sesión 5 en el grupo CS 8 mg/kg (Figura 15) comparado con su control (UMW=30.5, T=121.5, p=0.006). En la sesión 10, diferencias en la intensidad de señal fueron encontradas en ambos grupos (KW, H=11.860, df=3, p=0.008) comparados con sus respectivos controles (CS 8 mg/kg, UMW=39, T=130, p=0.021; CS 16 mg/kg, UMW=31.5, T=122.5, p=0.007). Finalmente, los valores de intensidad de señal del grupo CS 16 mg/kg (Figura 16) fueron significativamente diferentes a su sesión 1 (Prueba Friedman, $X^2=14$, df=2, p=<0.001; Tukey *post hoc*, q=5.27).

4.2.2.6. Glándula pituitaria

La intensidad de señal de la glándula pituitaria decreció en el grupo CS 16 mg/kg (Figura 16) en la sesión 10 comparado con su sesión 1 (Prueba Friedman, $X^2=14$, df=2, p=<0.001, Tukey *post hoc*, q=5.27).

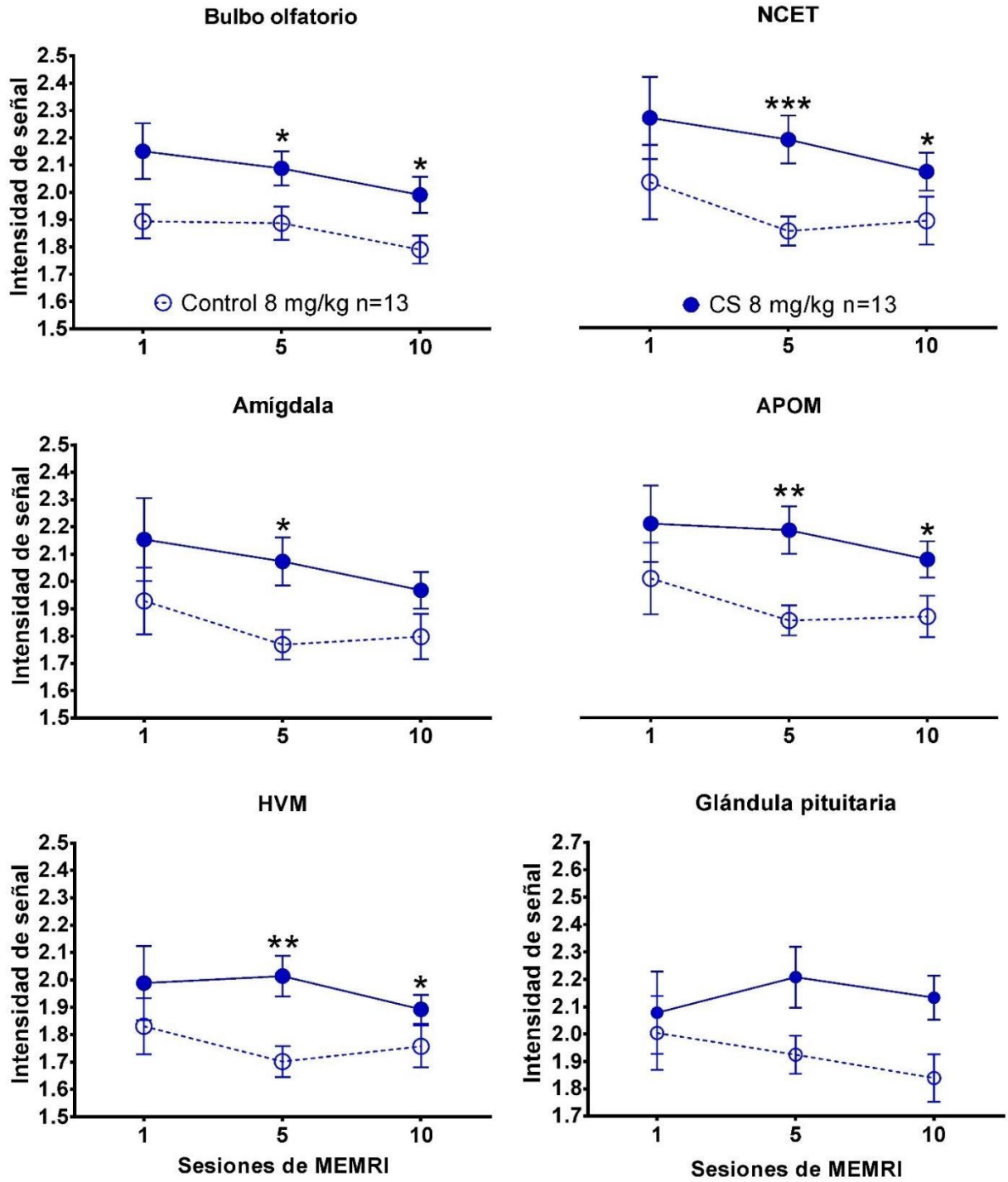


Figura 15. Diferencias de intensidad de señal en las regiones del circuito socio-sexual del grupo de conducta sexual de 8 mg/kg.
 * Diferencia entre el grupo Control y el CS en la misma sesión, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

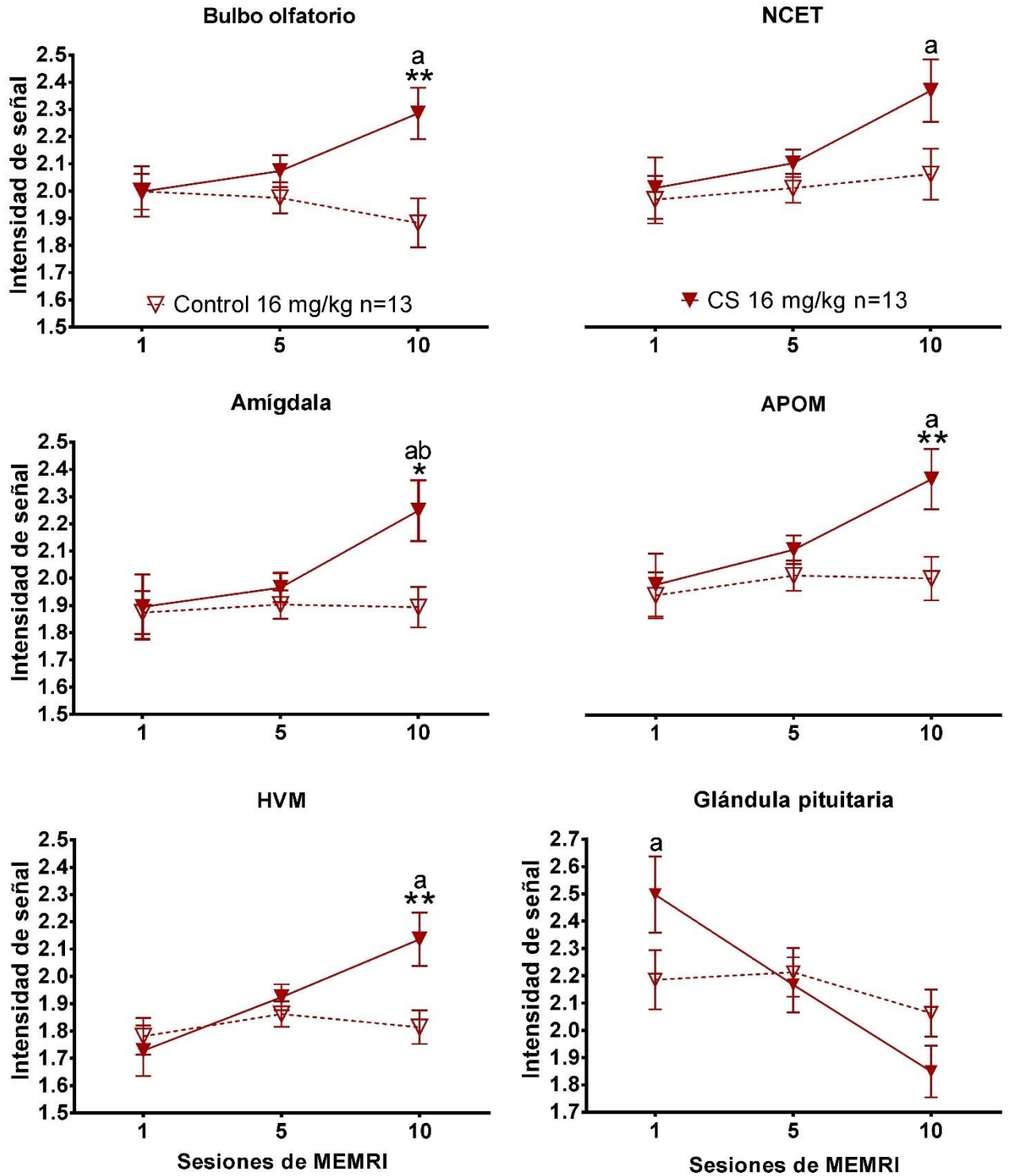


Figura 16. Diferencias de intensidad de señal en las regiones del circuito socio-sexual del grupo de conducta sexual de 16 mg/kg.

* Diferencia entre el grupo Control y el grupo CS en la misma sesión, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

a Diferencia intra grupal de CS 16 con la sesión 1, $p < 0.05$.

b Diferencia intra grupal de CS 16 con la sesión 5, $p < 0.05$.

4.2.2.7. Núcleo accumbens

La intensidad de señal incrementó significativamente en la sesión 5 (KW, $H=12.405$, $df=3$, $p=0.006$) y 10 (KW, $H=12.617$, $df=3$, $p=0.006$) en el grupo de CS 8 mg/kg (Figura 17) comparado con su control (UMW=31, $T=122$, $p=0.007$, UMW=37, $T=128$, $p=0.016$ respectivamente). El grupo de CS 16 mg/kg (Figura 18) también incrementó su intensidad de señal en la sesión 10 comparado con su control (UMW=44, $T=135$, $p=0.04$) y su sesión 1 ($X^2=9.846$, $df=2$, $p=0.007$, Tukey *post hoc*, $q=4.438$).

4.2.2.8. Cuerpo estriado

Diferencias en la intensidad de señal se encontraron en la sesión 5 (KW, $H=11.112$, $df=3$, $p=0.011$) en el grupo CS 8 mg/kg (Figura 17) comparado con su control (UMW=29, $T=120$, $p=0.005$) y en la sesión 10 (KW, $H=13.855$, $df=3$, $p=0.003$) con el grupo 16 mg/kg (Figura 18) respecto a su control (UMW=37.5, $T=128.5$, $p=0.017$) y con su sesión 1 (Prueba de Friedman, $X^2=8$, $df=2$, $p=0.018$; Tukey *post hoc*, $q=3.883$).

4.2.2.9. Hipocampo

Similar a resultados anteriores, un incremento de la intensidad de señal se encontró en la sesión 5 (KW, $H=8.063$, $df=3$, $p=0.045$) en el grupo de CS 8 mg/kg (Figura 17) comparado con su control (UMW=35.5, $T=126.5$, $p=0.013$). El grupo CS 16 mg/kg (Figura 18) mostró un incremento significativo de la intensidad de señal en la sesión 10 ($X^2=9.294$, $df=2$, $p=0.01$) respecto a su sesión 1 (Tukey *post hoc*, $q=4.16$).

4.2.2.10. Área tegmental ventral

Diferencias en la intensidad de señal fueron encontradas en ambos grupos CS (Figura 17, y 18 respectivamente) en la sesión 10 (KW, $H=10.59$, $df=3$, $p=0.014$) comparado con sus respectivos controles (UMW=38.5, $T=129.5$, $p=0.019$; UMW=33, $T=124$, $p=0.009$ respectivamente). El grupo CS 16 mg/kg tuvo un incremento de intensidad de señal en la sesión 10 ($X^2=9.692$, $df=2$, $p=0.008$), comparado con su sesión 5 (Tukey *post hoc*, $q=3.328$) y 1 (Tukey *post hoc*, $q=4.16$).

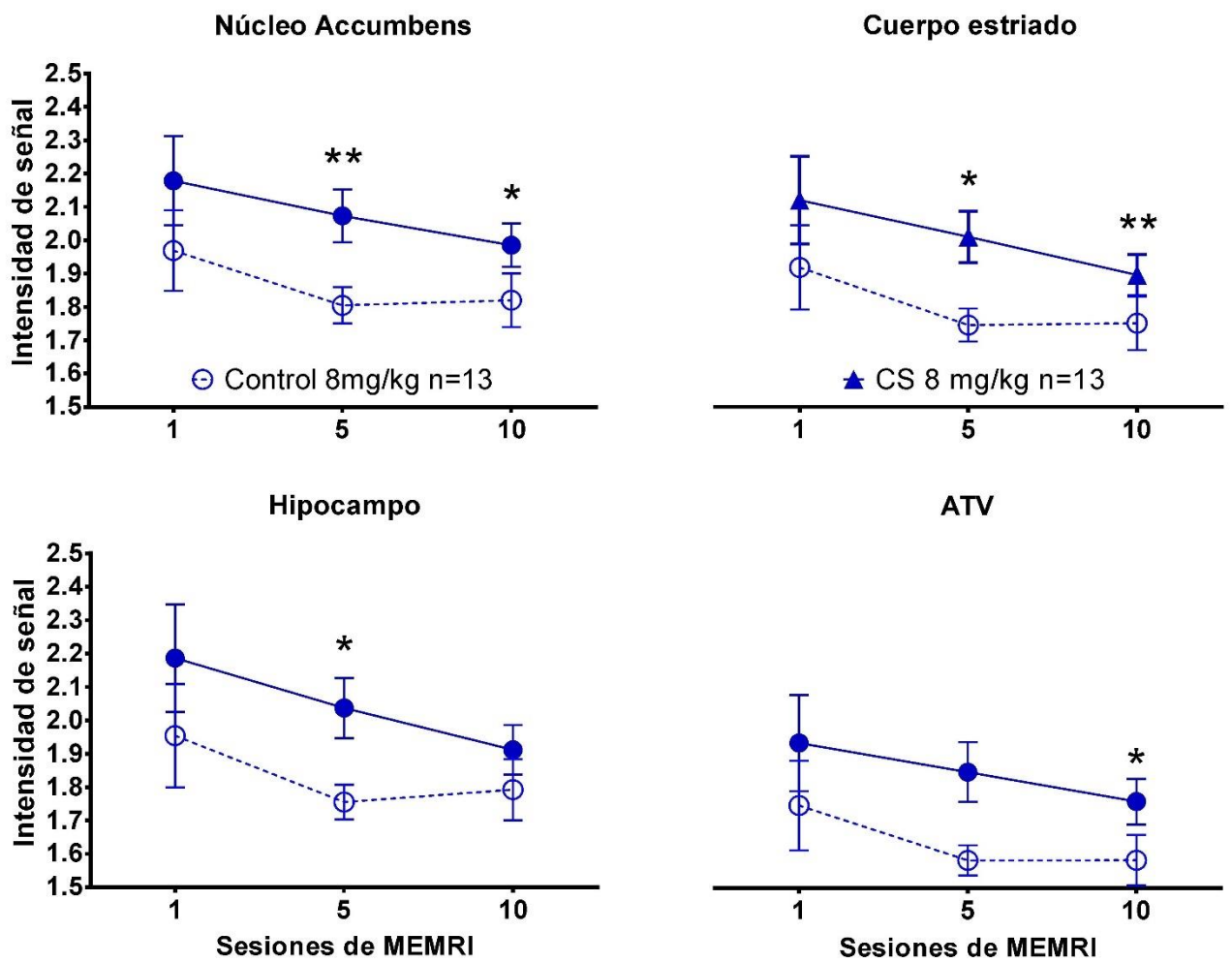


Figura 17. Diferencias de intensidad de señal en las regiones del circuito de recompensa del grupo de conducta sexual de 8 mg/kg. Regiones cerebrales analizadas en el Experimento 2.

* Diferencia entre el grupo Control y el grupo CS en la misma sesión, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

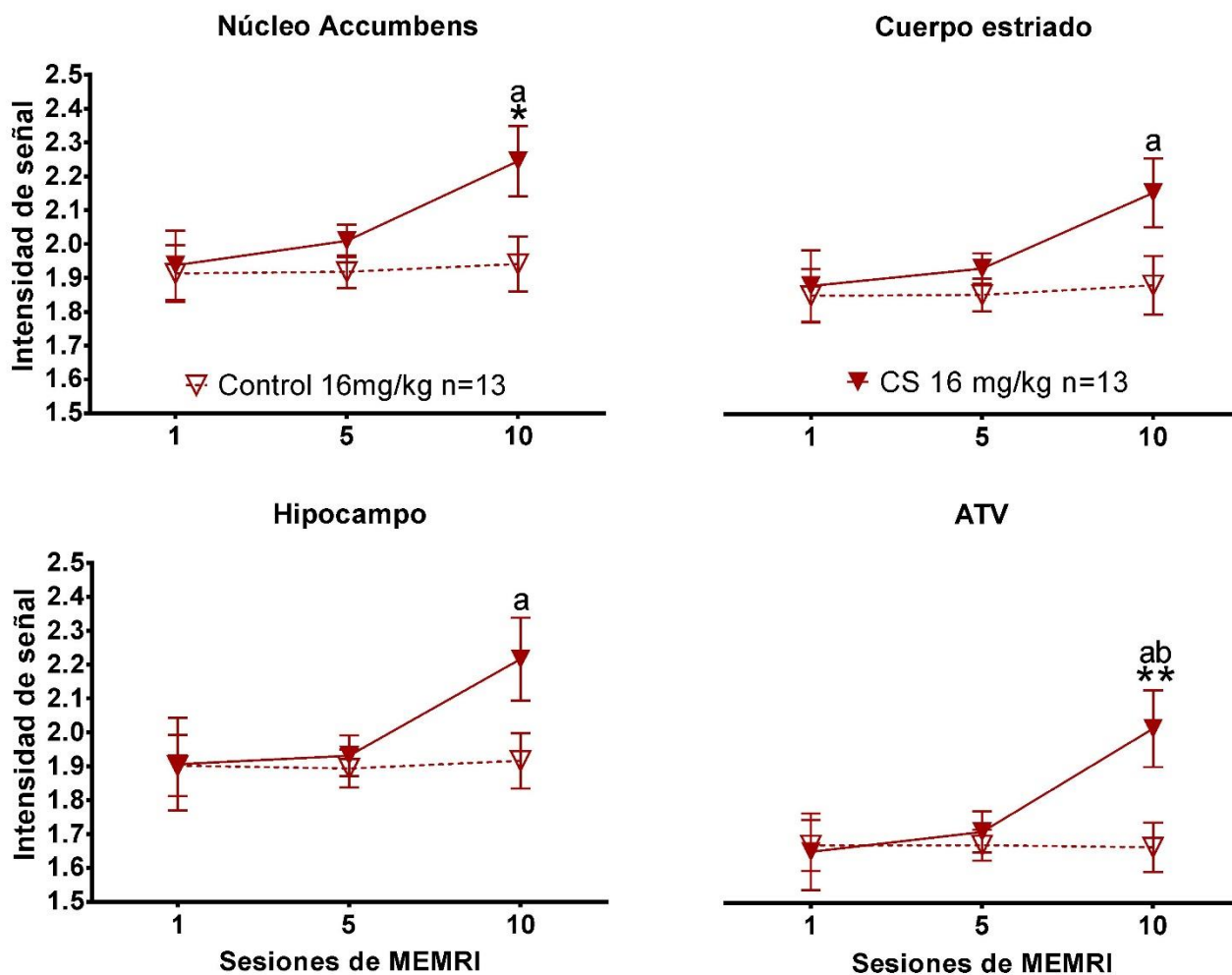


Figura 18. Diferencias de intensidad de señal en las regiones del circuito de recompensa del grupo de conducta sexual de 16 mg/kg. Regiones cerebrales analizadas en el Experimento 2.

* Diferencia entre el grupo Control y el grupo CS en la misma sesión, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

a Diferencia intra grupal del grupo CS 16 con la sesión 1, $p < 0.05$.

b Diferencia intra grupal del grupo CS 16 con la sesión 5, $p < 0.05$.

4.2.2.11. Porcentaje de cambio de señal

Se analizó el porcentaje de cambio de intensidad de señal en la sesión 10 respecto a la sesión 1 de los grupos (Figura 19). Se analizaron las regiones del circuito sexual, de recompensa y regiones control (regiones no asociadas a la regulación de la conducta sexual). Cuando se compara el incremento de la señal en ambos grupos se observa que las regiones del circuito sexual son las que tienen un incremento significativo de la señal respecto a la sesión 1 comparado con las regiones del circuito de recompensa y las regiones control.

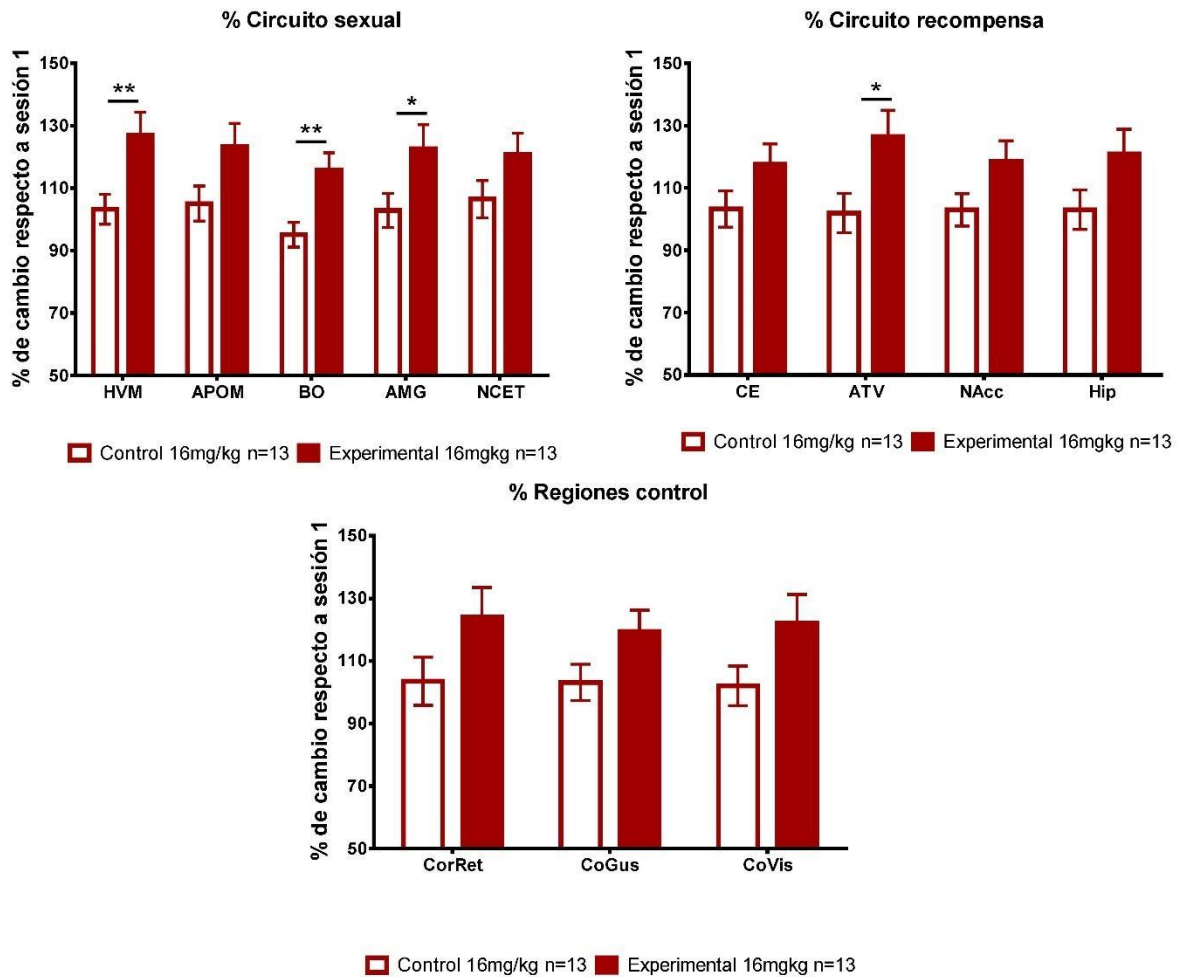


Figura 19. Análisis del cambio de intensidad de señal en la sesión 10 respecto a la sesión 1. Regiones de los circuitos socio-sexual, recompensa y regiones control. * Diferencia entre el grupo Control y el Experimental en la misma sesión, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

4.2.3. Análisis por circuitos cerebrales

De acuerdo a la literatura (O'Connell & Hofmann, 2011), los datos obtenidos de cada una de las estructuras fueron agrupados en dos circuitos principales: el circuito de las conductas socio-sexuales (área preóptica medial, hipotálamo ventromedial y núcleo de la cama de la estría terminal) y el circuito de recompensa (área tegmental ventral, hipocampo y núcleo accumbens). A continuación, se presentan los resultados de este análisis.

4.2.3.1. Circuito socio-sexual

Diferencias significativas en la intensidad de señal se encontraron en la sesión 5 (UMW=1559, T=4811, $p=0.01$) y la sesión 10 (UMW=946.5, T=5423.5, $p<0.001$) entre el grupo control y el grupo de conducta sexual (Figura 20). En la prueba de Friedman mostró un incremento constante en la intensidad de señal ($X^2=57.723$, $df=2$, $p<0.001$) del circuito socio-sexual del grupo de conducta sexual, siendo mayor la intensidad de señal en la sesión 5 ($q=4.217$) y 10 ($q=10.667$) respecto a la sesión 1, y la intensidad de señal mayor que la sesión 5 ($q=6.45$). No se encontraron cambios en la intensidad de señal en el grupo control.

4.2.3.2. Circuito de recompensa

Las comparaciones del circuito de recompensa mostraron diferencias en la sesión 10 (UMW=758, T=3324, $df=2$, $p<0.001$), siendo mayor la intensidad de señal del grupo de conducta sexual (Figura 20). La prueba de Friedman indicó que el incremento de la intensidad de señal sucedió en la sesión 10 ($X^2=36.203$, $df=2$, $p<0.001$) respecto a la sesión 1 ($q=8.321$) y a la sesión 5 ($q=5.616$).

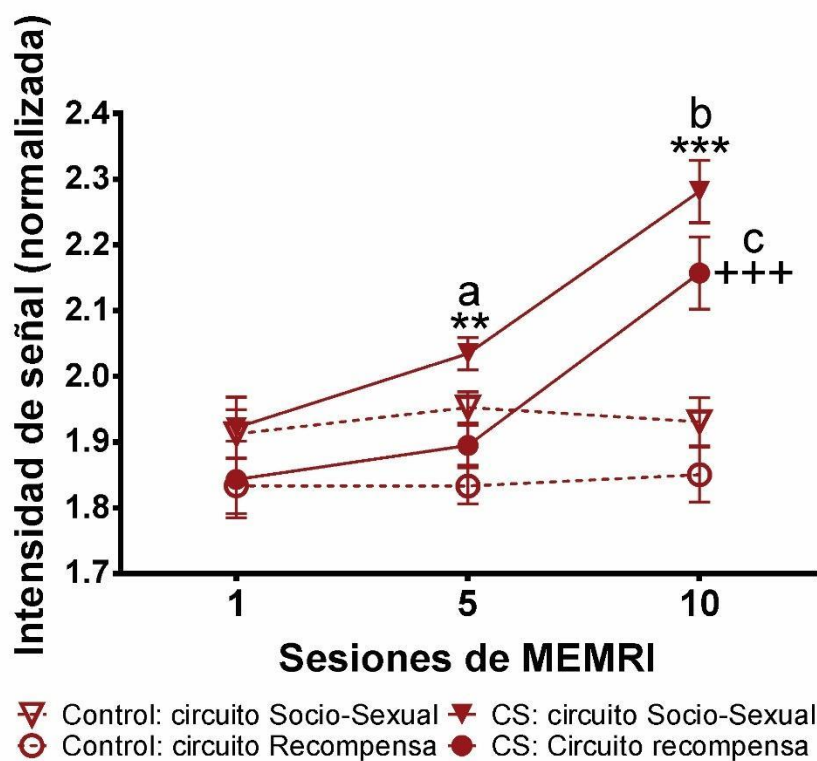


Figura 20. Circuitos cerebrales. Comparación entre los circuitos de respuesta socio-sexual y recompensa en los grupos de 16 mg/kg, de conducta sexual y control.
 ** Diferencia entre CS: circuito Socio-Sexual con Control: Socio-Sexual, $p < 0.01$
 *** Diferencia entre CS: circuito Sexual y Recompensa contra sus controles, $p < 0.001$
 a Diferencia en CS: circuito Socio-Sexual con la sesión 1
 b Diferencia en CS: circuito Socio-Sexual con la sesión 5
 c Diferencia en CS: circuito Recompensa con la sesión 1 y 5

4.2.4. Análisis por vóxel y D de Cohen.

Se realizó un análisis por vóxel de todo el cerebro. Se hicieron comparaciones inter e intra grupales, comparando el grupo control contra el grupo conducta sexual, así como comparaciones del grupo de conducta sexual a lo largo de sus sesiones para ver el tamaño del efecto de acuerdo con la D de Cohen.

Las comparaciones del grupo control contra el grupo de conducta sexual de 16 mg/kg calculando la D de Cohen (Figura 21) muestran un incremento significativo ($d > 1.2$) en la magnitud de cambio en regiones del circuito sexual, como el bulbo olfatorio, el núcleo de la cama de la estria terminal, el área preóptica medial, el hipotálamo ventromedial y la amígdala; regiones del circuito de recompensa muestran incrementos en la magnitud de cambio ($d = 0.9$), pero en menor proporción que las áreas del circuito sexual. Regiones del núcleo accumbens, el cuerpo estriado, el área tegmental ventral y zonas específicas del hipocampo, como el giro dentado mostraron incrementos en la magnitud de cambio respecto a los controles.

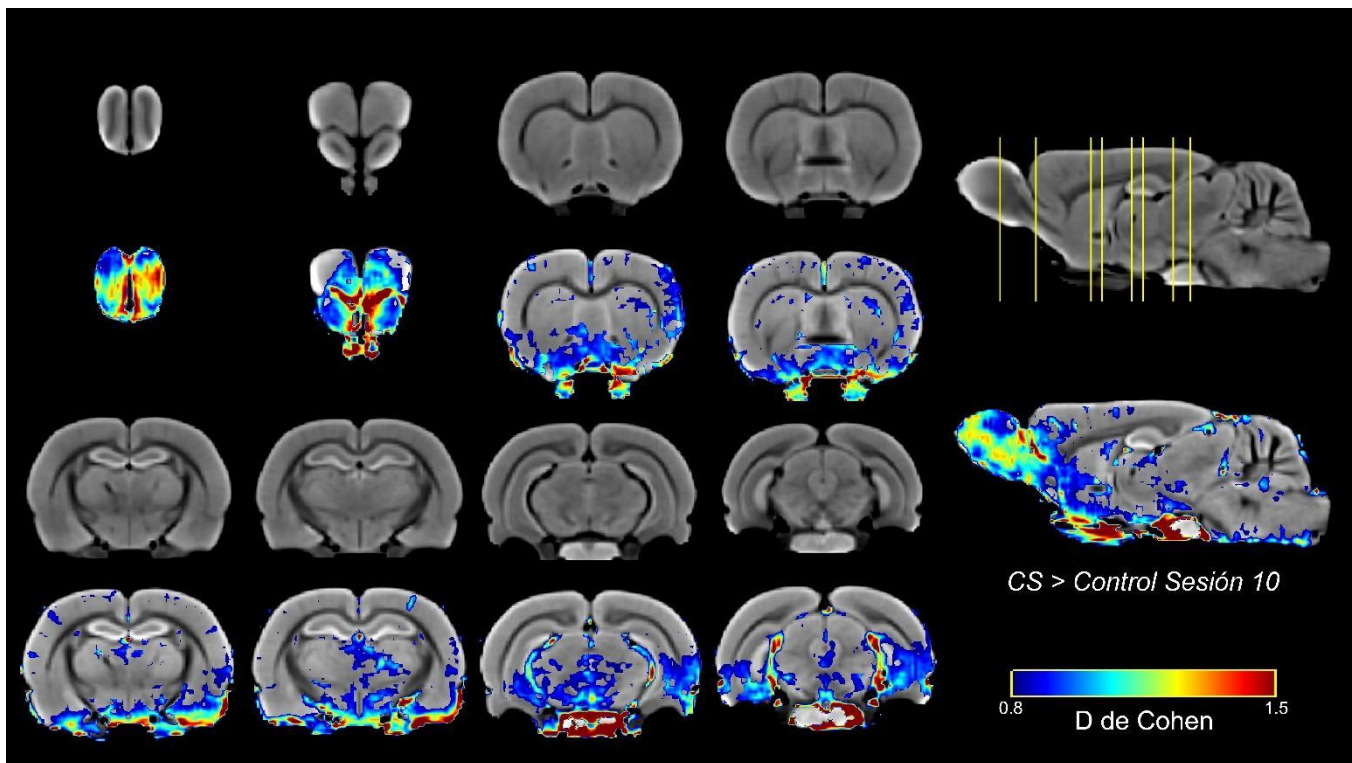


Figura 21. Mapas del tamaño del efecto de las diferencias en actividad neuronal entre grupos. Resultados del análisis de la D de Cohen en la comparación de la sesión 10 del grupo control contra el grupo de conducta sexual con dosis de 16 mg/kg.

Los resultados de la comparación de la sesión 10 contra la sesión 1 del grupo conducta sexual (Figura 22) muestran una distribución similar a la obtenida de la comparación con el grupo control. Regiones del circuito de respuesta socio-sexual y recompensa mostraron incrementos en la magnitud de cambio ($d > 1.2$, $d = 0.7-0.9$, respectivamente) en las imágenes de la sesión 10 comparadas con la sesión 1. Estos datos nos ayudan a comprender que es necesario que se incremente el tiempo de estimulación para que se genere una mayor actividad neuronal y por tanto incrementar la acumulación de manganeso, ya que los cambios de intensidad de señal de hembras que copularon una sola sesión resultan similares al de unas hembras control.

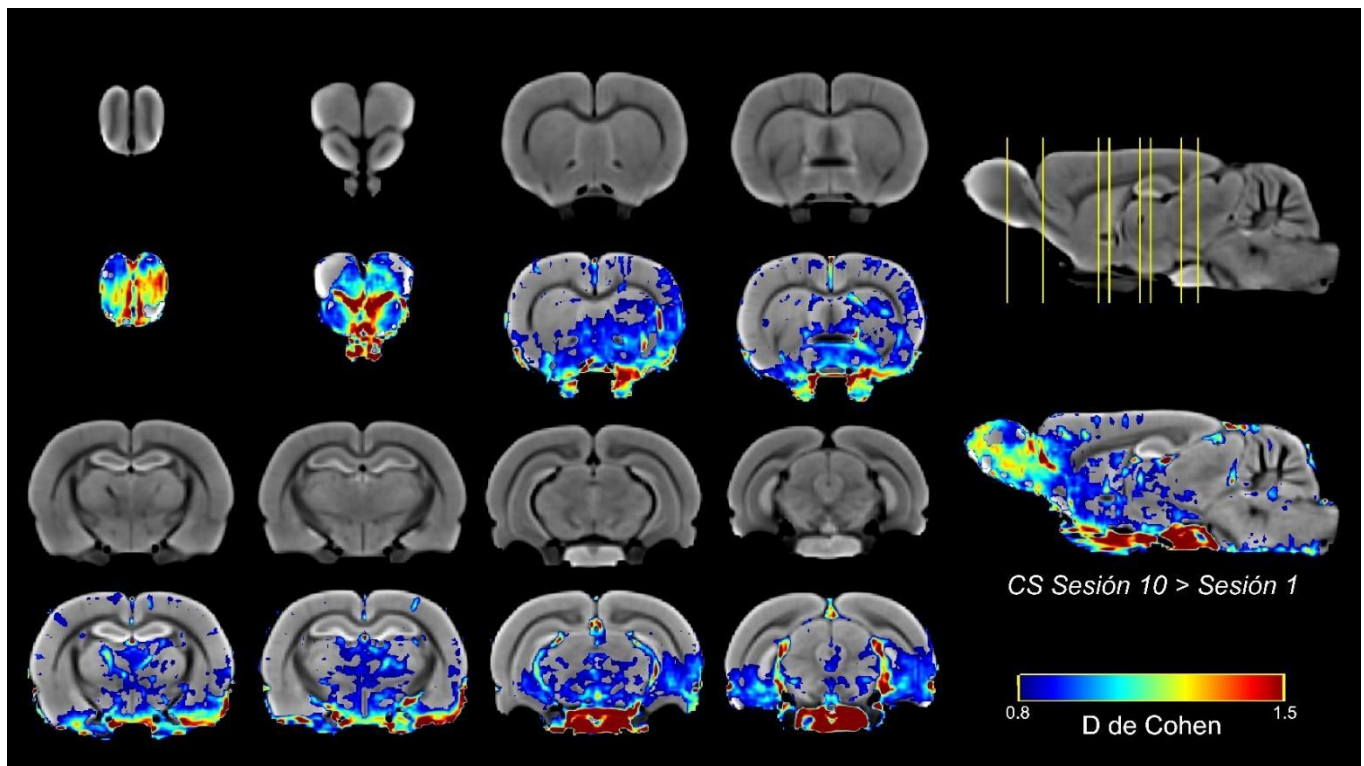


Figura 22. Mapas del tamaño del efecto de las diferencias en actividad neuronal entre sesiones 1 y 10. Resultados del análisis de la D de Cohen en la comparación de la sesión 10 del grupo de conducta sexual con dosis de 16 mg/kg contra su sesión 1.

Cuando se compara la sesión 10 con la sesión 5 (Figura 23) se identifica un patrón de cambio distinto a los ya obtenidos, donde los incrementos de la magnitud de cambio son mayores en los circuitos de respuesta socio-sexual (exceptuando el bulbo olfatorio) y recompensa ($d > 1.2$).

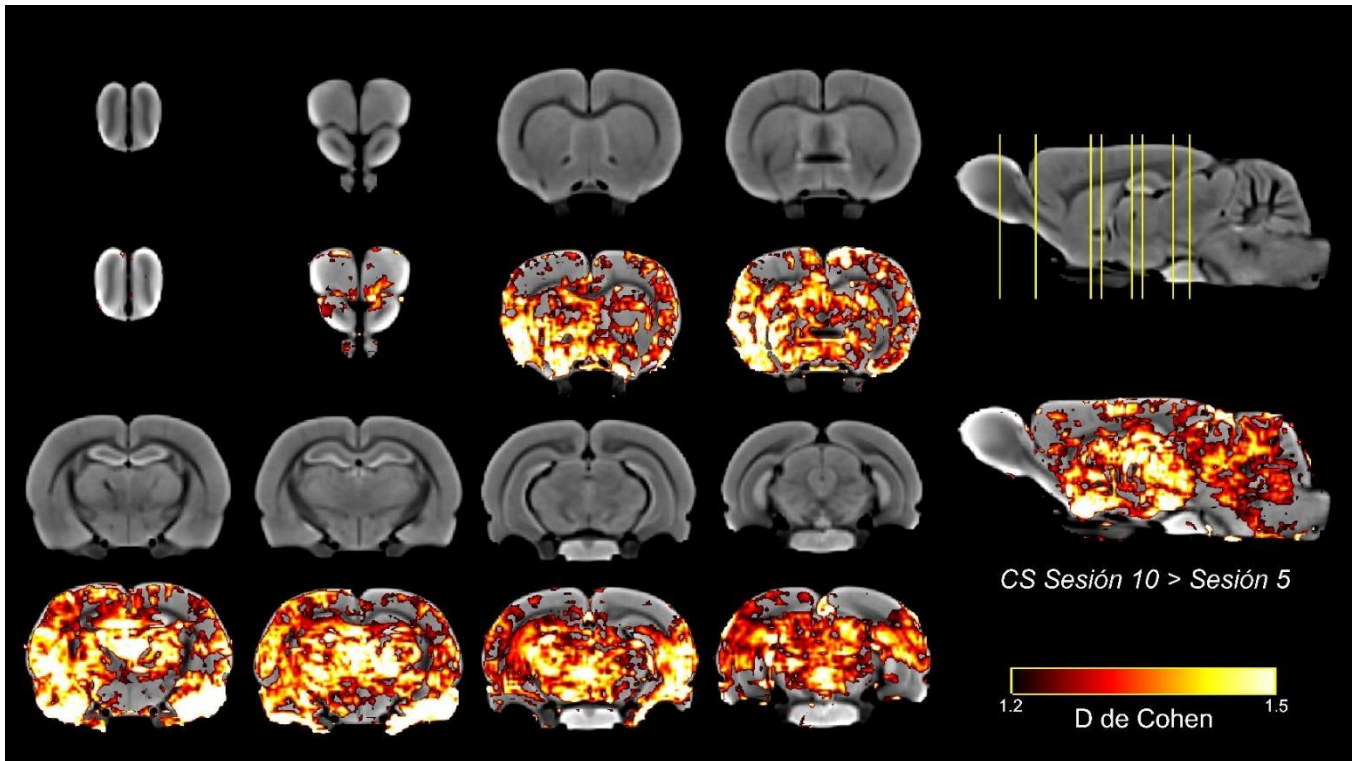


Figura 23. Mapas del tamaño del efecto de las diferencias en actividad neuronal entre sesiones 10 y 5. Resultados del análisis de la D de Cohen en la comparación de la sesión 10 del grupo de conducta sexual con dosis de 16 mg/kg contra su sesión 5.

4.3. Experimento 3

EL objetivo del Experimento 3 es identificar la activación neuronal del circuito de respuesta socio-sexual y el de recompensa en hembras expuestas a un macho sexualmente experto, hembras que regulan los contactos copulatorios y hembras que no regulan los contactos copulatorios, a lo largo de 10 sesiones, con una sesión por semana.

4.3.1. Conducta sexual

A continuación se presentan los datos de las pruebas de conducta sexual del Experimento 3 (Tabla 9). Encontramos diferencias significativas en el número de montas e intromisiones, siendo mayor en el grupo de cópula no regulada respecto al grupo de cópula regulada en la sesión 10. No se encontraron diferencias significativas en las comparaciones intragrupalas a lo largo de las sesiones.

Tabla 7. Resultados de la prueba de conducta sexual del Experimento 3. Se muestran las sesiones 1, 5 y 10 de las hembras que copularon. Los datos son expresados en media \pm error estándar.

Grupo	Regulada (n=11)			No regulada (n=11)		
	Sesión	1	5	10	1	5
# de evento						
Monta	8.7 \pm 1.7	10.5 \pm 2.5	5.1 \pm 2	17 \pm 4.5	15.6 \pm 4.78	16.72 \pm 5.16*
Intromisión	19.45 \pm 2.7	26.7 \pm 2.7	15.18 \pm 3.9	29 \pm 4.9	29.3 \pm 3.2	28 \pm 3.9*
Eyaculación	2 \pm 0.3	3.3 \pm 0.3	2.5 \pm 0.6	3.1 \pm 0.5	4 \pm 0.4	3.9 \pm 0.5
Latencia (s)						
Monta	104.2 \pm 27.3	78.63 \pm 23.2	37.45 \pm 12.18	175.8 \pm 141	52.8 \pm 24.39	38.5 \pm 23.86
Intromisión	115.1 \pm 28.2	95.4 \pm 28.8	126.9 \pm 59.4	222.5 \pm 140.1	91.36 \pm 58.1	51.72 \pm 25.4
Eyaculación	749.2 \pm 162.4	631.7 \pm 126.5	323 \pm 117.5	789.4 \pm 260.8	571.5 \pm 140.3	382.5 \pm 66.3
III (s)	58.5 \pm 13.5	47.6 \pm 13.1	34.6 \pm 14.1	59.5 \pm 18.7	53.3 \pm 16.8	28.4 \pm 4
IPE	378.5 \pm 57.1	380.2 \pm 30.1	208.9 \pm 51.63	425.1 \pm 64.6	409.3 \pm 43.5	306.1 \pm 40.8
IML	1.98 \pm 0	2 \pm 0	1.45 \pm 0.2	1.9 \pm 0	2 \pm 0	1.8 \pm 0.2
CL	100 \pm 0	100 \pm 0	72.7 \pm 14.1	100 \pm 0	100 \pm 0	90.9 \pm 9.1
% de salida						
Monta	12.4 \pm 5.6	19 \pm 6.7	0 \pm 0			
Intromisión	37.9 \pm 10.9	70.4 \pm 9.9	46.3 \pm 12.5			
Eyaculación	90.9 \pm 9.1	100 \pm 0	63.6 \pm 15.2			
Latencia de regreso (s)						
Monta	3.7 \pm 1.7	3.5 \pm 1.3	0 \pm 0			
Intromisión	37.9 \pm 15.9	23.3 \pm 10.2	18.8 \pm 6.1			
Eyaculación	70.6 \pm 22.5	97.7 \pm 22.2	51.6 \pm 16.9			

* Diferencia significativa en la misma sesión con el grupo de cópula regulada.

4.3.2. MEMRI

Después de las evaluaciones conductuales, en las sesiones 1, 5 y 10, las hembras fueron llevadas al Laboratorio Nacional de Resonancia Magnética para ser escaneadas. El análisis de las imágenes se realizó de la misma manera que en el Experimento 2, utilizando las máscaras de las estructuras asociadas a los circuitos de recompensa y de conductas socio-sexuales.

4.3.2.1. Bulbo Olfatorio

No se encontraron diferencias en la intensidad de señal en las sesiones 1, 5 o 10 (sesión 1, $H=5.486$, $df=3$, $p=0.14$; sesión 5, $H=1.869$, $df=3$, $p=0.6$; sesión 10, $H=1.755$, $df=3$, $p=0.625$) del bulbo olfatorio (Figura 24) entre los diferentes grupos. El grupo de cópula no regulada incrementó su intensidad de señal (Prueba de Friedman, $X^2=7.091$, $df=2$, $p=0.029$) en la sesión 5 respecto a su sesión 1 (Tukey *post hoc*, $q=3.618$)

4.3.2.2. Núcleo de la cama de la estría terminal

No hubo diferencias significativas en la intensidad de señal en las sesiones 1, 5 o 10 (sesión 1, $H=2.913$, $df=3$, $p=0.405$; sesión 5, $H=5.183$, $df=3$, $p=0.159$; sesión 10, $H=0.724$, $df=3$, $p=0.868$). La prueba de Friedman reveló el incremento de la intensidad de señal ($X^2=12.8$, $df=2$, $p=0.002$) en el grupo de hembras expuestas a un macho sexualmente experto (Figura 24) en la sesión 10 respecto a su sesión 1 ($q=5.06$). El grupo de cópula no regulada presentó un incremento de señal ($X=11.636$, $df=2$, $p=0.003$) en la sesión 5 respecto en la sesión 1 ($q=4.824$). Las hembras que regularon los contactos copulatorios mostraron un constante incremento de señal ($X^2=8.909$, $df=2$, $p=0.012$) en la sesión 5 ($q=3.92$) y 10 ($q=3.317$) respecto con su sesión 1.

4.3.2.3. Amígdala

De igual manera no se encontraron diferencias en la intensidad de señal entre los grupos (Figura 24) (sesión 1, $H=1.598$, $df=3$, $p=0.66$; sesión 5, $H=5.552$, $df=3$, $p=0.136$; sesión 10, $H=1.18$, $df=3$, $p=0.758$). Los resultados de la prueba de Friedman revelaron diferencias en la intensidad de señal del grupo exposición ($X^2=8.6$, $df=2$, $p=0.014$) en la sesión 10 comparado con su sesión 1 ($q=4.111$). Los grupos de cópula incrementaron su señal en la sesión 5 respecto a su sesión 1 (no regulada, $X^2=8.512$, $df=2$, $p=0.014$, $q=4.07$; regulada, $X^2=8.791$, $df=2$, $p=0.012$, $q=4.07$).

4.3.2.4. Área preóptica medial

De forma similar a las regiones anteriores, no se encontraron diferencias de intensidad de señal entre los grupos en el área preóptica medial (Figura 24) (sesión 1, $H=1.303$, $df=3$, $p=0.728$; sesión 5, $H=4.543$, $df=3$, $p=0.209$; sesión 10, $H=0.399$, $df=3$, $p=0.94$). La prueba de Friedman reporta un incremento de señal en la sesión 10 del grupo exposición ($X^2=11.105$, $df=2$, $p=0.004$) respecto a su sesión 1 ($q=4.585$).

4.3.2.5. Hipotálamo ventromedial

Los datos del HVM no presentan diferencias significativas en la intensidad de señal (Figura 24) entre los grupos con la prueba de Kruskal-Wallis (sesión 1, $H=0.898$, $df=3$, $p=0.826$; sesión 5, $H=5.684$, $df=3$, $p=0.128$; sesión 10, $H=0.0614$, $df=3$, $p=0.996$). En la prueba de Friedman, solo el grupo de cópula regulada mostró un incremento de señal en la sesión 5 ($X^2=7.818$, $df=2$, $p=0.02$) respecto a su sesión 1 ($q=3.92$).

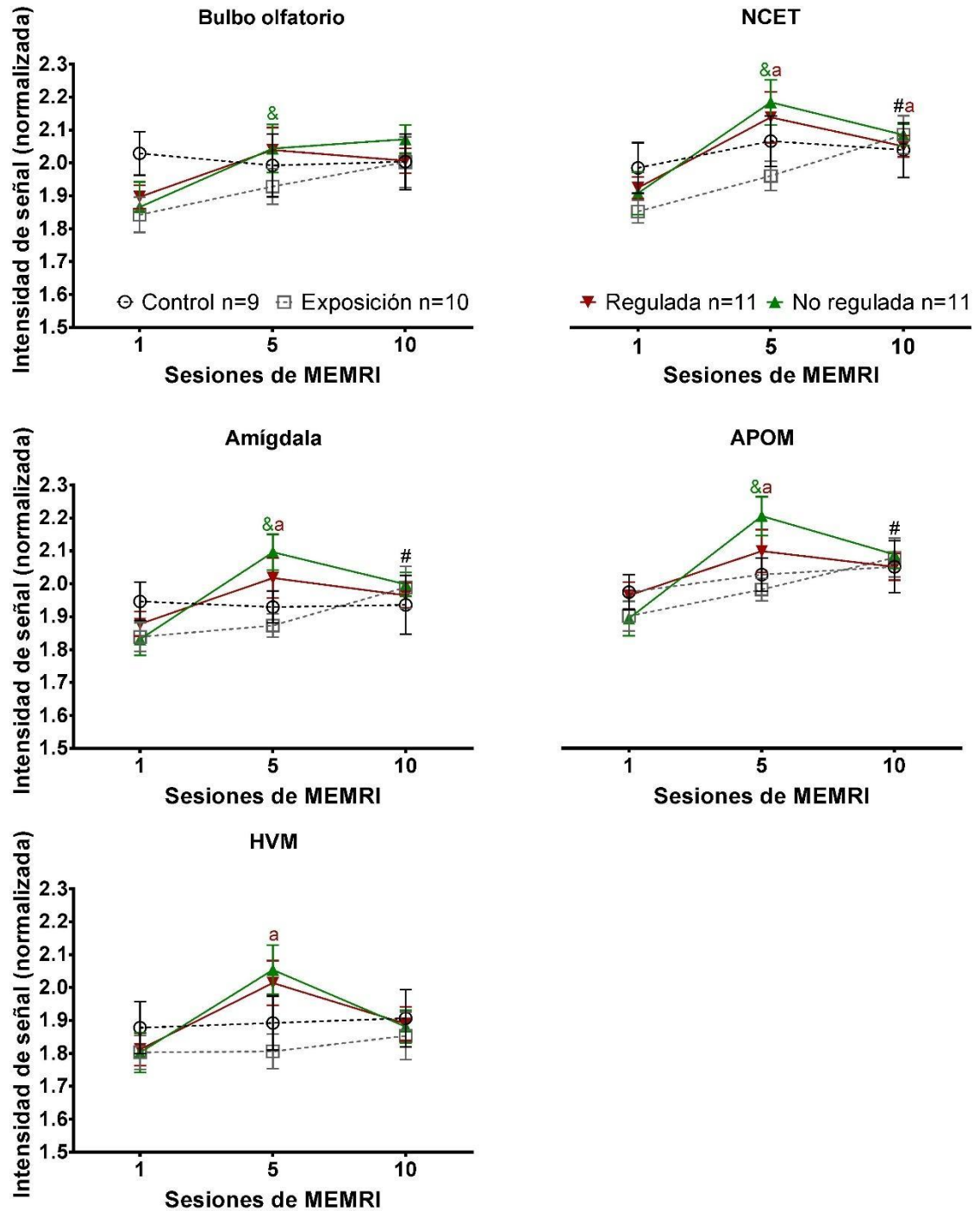


Figura 24. Regiones individuales del circuito socio-sexual de los grupos del Experimento 3. Resultados del análisis de intensidad de señal por región en las diferentes sesiones de cada grupo de las regiones del circuito socio-sexual.
 # Diferencia del grupo Exposición contra su sesión 1, $p < 0.05$
 & Diferencia del grupo No regulada contra su sesión 1, $p < 0.05$
 a Diferencia del grupo Regulada contra su sesión 1, $p < 0.05$

4.3.2.6. Núcleo accumbens

No encontramos diferencias significativas entre los grupos por sesión cuando analizamos la actividad del núcleo accumbens (Figura 25) no fueron significativamente diferentes entre los grupos por sesión (sesión 1, $H=3.061$, $df=3$, $p=0.382$; sesión 5, $H=3.804$, $df=3$, $p=0.283$; sesión 10, $H=1.044$, $df=3$, $p=0.791$). La prueba de Friedman reveló que el grupo de cópula no regulada mostró un incremento de intensidad de señal ($X^2=10.465$, $df=2$, $p=0.005$) en la sesión 5 respecto a su sesión 1 ($q=4.523$).

4.3.2.7. Cuerpo estriado

No se encontraron diferencias significativas de intensidad de señal (Figura 25) entre los grupos (sesión 1, $H=2.381$, $df=3$, $p=0.497$; sesión 5, $H=4.596$, $df=3$, $p=0.204$; sesión 10, $H=2.078$, $df=3$, $p=0.556$). Diferencias de intensidad de señal se encontraron en el grupo de cópula no regulada ($X^2=7.818$, $df=2$, $p=0.02$) en la sesión 5 comparada con su sesión 1 ($q=3.920$).

4.3.2.8. Hipocampo

Los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis sobre la intensidad de señal no mostraron diferencias significativas entre los grupos (sesión 1, $H=2.638$, $df=3$, $p=0.451$; sesión 5, $H=6.429$, $df=3$, $p=0.092$; sesión 10, $H=2.638$, $df=3$, $p=0.451$) (Figura 25). La prueba de Friedman reveló que los grupos de cópula incrementaron su intensidad de señal (cópula no regulada, $X^2=6.186$, $df=2$, $p=0.045$; cópula regulada, $X^2=7.302$, $df=2$, $p=0.026$) en la sesión 5 respecto a su propia sesión 1 ($q=3.467$ y $q=3.769$, respectivamente).

4.3.2.9. Área tegmental ventral

De la misma manera que las regiones anteriores (Figura 25), no se encontraron diferencias en la intensidad de señal entre los grupos (sesión 1, $H=1.715$, $df=3$, $p=0.634$; sesión 5, $H=4.679$, $df=3$, $p=0.197$; sesión 10, $H=1.922$, $df=3$, $p=0.589$). El grupo de cópula no regulada mostró un incremento de intensidad de señal en la sesión 5 ($X^2=6.837$, $df=2$, $p=0.033$) comparada con su sesión 1 ($q=3.618$).

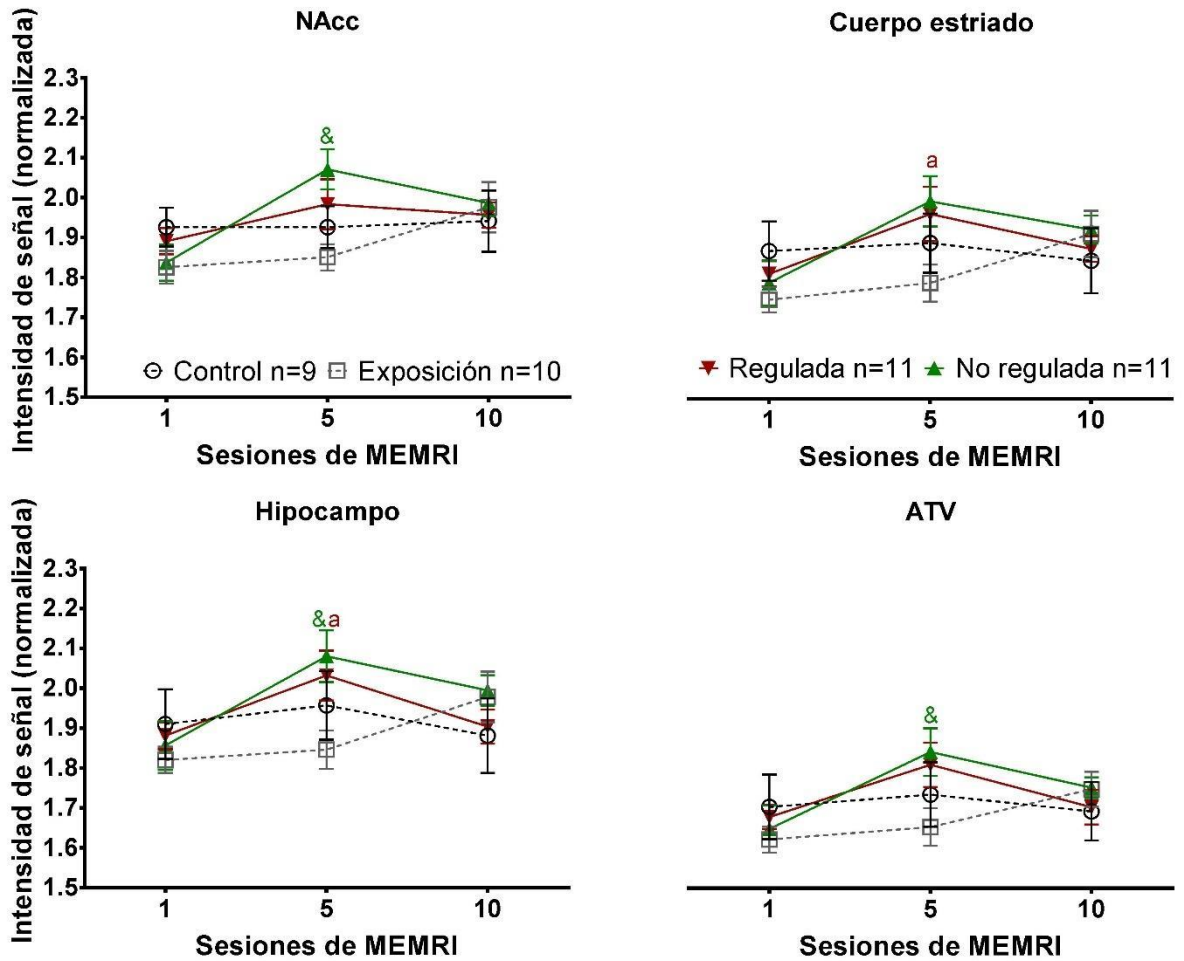


Figura 25. Regiones individuales del circuito de recompensa de los grupos del Experimento 3. Resultados del análisis de intensidad de señal por región en las diferentes sesiones de cada grupo en las áreas del circuito de recompensa.

Diferencia del grupo Exposición contra su sesión 1, $p < 0.05$
 & Diferencia del grupo No regulada contra su sesión 1, $p < 0.05$
 a Diferencia del grupo Regulada contra su sesión 1, $p < 0.05$

4.3.3. Análisis por circuitos cerebrales

Así como en el Experimento 2, se realizó el análisis de la intensidad de señal por el circuito socio-sexual y el circuito de recompensa.

4.3.3.1. Circuito socio-sexual

Los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis del circuito socio-sexual (Figura 26) demostraron que existen diferencias de intensidad de señal entre el grupo control con el grupo de cópula no regulada en la sesión 5 (KW, $H=20.458$, $df=3$, $p<0.001$; UMW=921, $T=1956$, $p=0.029$). En cuanto a la prueba de Friedman se identificaron los siguientes resultados: el grupo de exposición tiene diferencias de intensidad de señal ($X^2=29.726$, $df=2$, $p<0.001$) en la sesión 5 respecto a su sesión 1 y 10 (Tukey, $q=4.243$ y $q=3.394$, respectivamente), y en la sesión 10 respecto a su sesión 1 ($q=7.637$); el grupo de cópula no regulada mostró diferencias de intensidad de señal ($X^2=37.779$, $df=2$, $p<0.001$) en la sesión 5 respecto a su sesión 1 y 10 (Tukey, $q=8.63$ y $q=4.113$, respectivamente), y en la sesión 10 respecto a su sesión 1 ($q=4.517$); el grupo de cópula regula mostró diferencias significativas ($X^2=29.731$, $df=2$, $p<0.001$) en la sesión 5 ($q=7.618$) y 10 ($q=4.315$) respecto a su sesión 1.

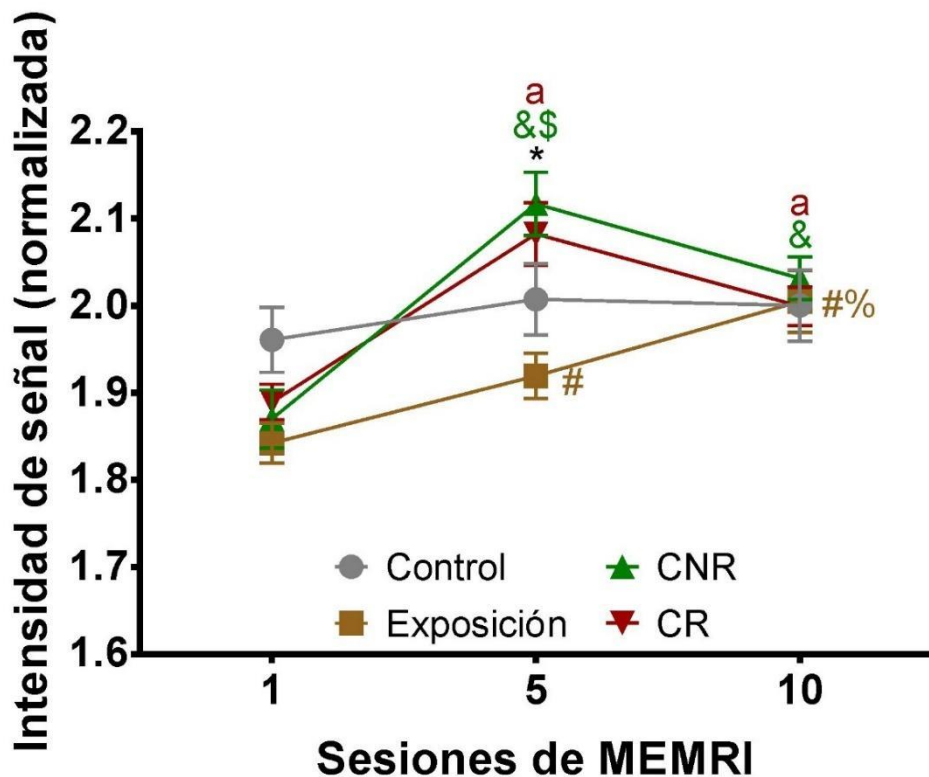


Figura 26. Circuito socio-sexual. Comparación entre los circuitos de respuesta socio-sexual entre los sujetos control, hembras expuestas a un macho, hembras no regularon los contactos copulatorios y hembras que regularon los contactos copulatorios. CNR, cópula no regulada; CR, cópula regulada.

* Diferencia del grupo No regulada contra el Control, $p < 0.05$

Diferencia del grupo Exposición contra su sesión 1, $p < 0.05$

% Diferencia del grupo Exposición contra su sesión 5, $p < 0.05$

& Diferencia del grupo No regulada contra su sesión 1, $p < 0.05$

\$ Diferencia del grupo No regulada contra su sesión 10, $p < 0.05$

a Diferencia del grupo Regulada contra su sesión 1, $p < 0.05$

4.3.3.2. Circuito de recompensa

Las comparaciones entre los grupos con la prueba de Kruskal-Wallis demostraron que existen diferencias significativas de intensidad de señal $UMW=511$, $T=1331$, $p<0.001$), siendo mayor en los grupos de cópula no regulada ($UMW=442.5$, $T=1262.5$, $p<0.001$) y regulada ($UMW=511$, $T=1331$, $p<0.001$) respecto al grupo de exposición (Figura 27). El análisis con la prueba de Friedman para medidas repetidas mostró los siguientes resultados: el grupo de exposición mostró un incremento de intensidad de señal ($X^2=17.774$, $df=2$, $p<0.001$) en la sesión 5 respecto a la sesión 10 ($q=3.32$) y en la sesión 10 respecto a la 1 ($q=5.929$); el grupo de cópula no regulada mostró un incremento de intensidad de señal ($X^2=30.671$, $df=2$, $p<0.001$) en la sesión 5 respecto a su sesión 1 y 10 ($q=7.764$ y $q=3.769$ respectivamente), y en la sesión 10 respecto a su sesión 1 ($q=3.995$); el grupo de cópula regulada por la hembra mostró un incremento de intensidad de señal ($X^2=18.046$, $df=2$, $p<0.001$) en las sesiones 5 y 10 respecto a su sesión 1 ($q=5.955$ y $q=3.543$ respectivamente).

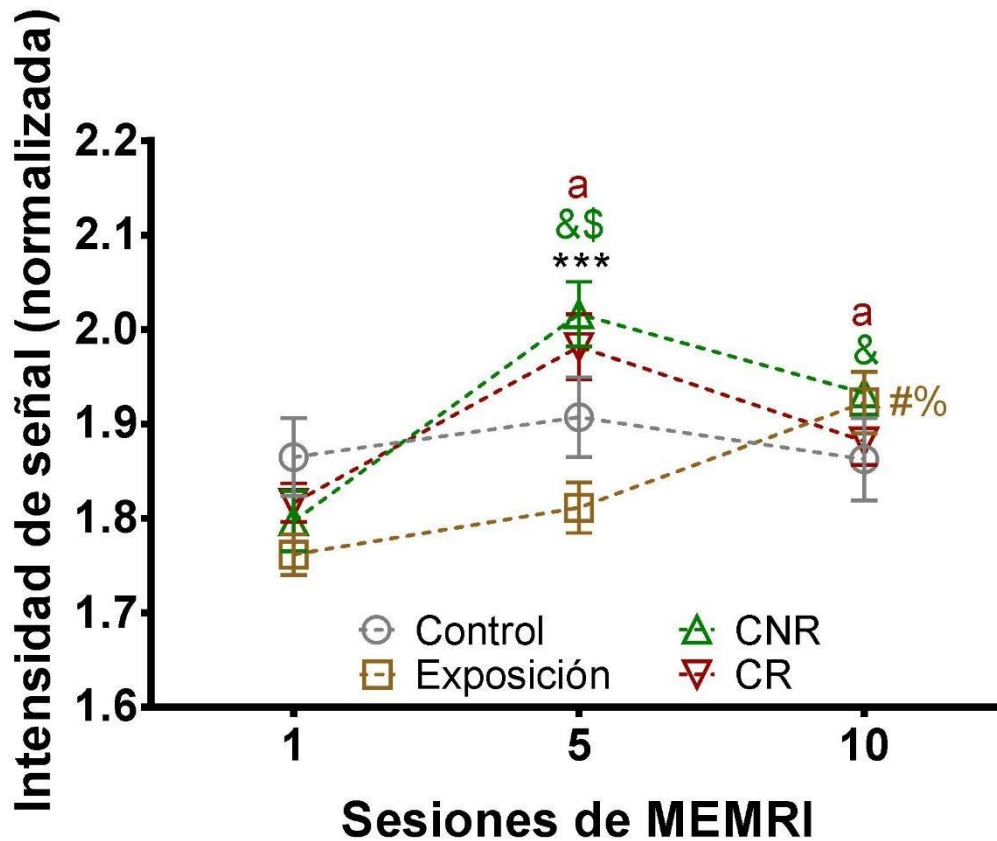


Figura 27. Circuito recompensa. Comparación entre los circuitos de recompensa entre los sujetos control, hembras expuestas a un macho, hembras no regularon los contactos copulatorios (CNR) y hembras que regularon los contactos copulatorios (CR). CNR, cópula no regulada; CR, cópula regulada.

*** Diferencia del grupo Regulada y No regulada contra Exposición, $p < 0.001$

Diferencia del grupo Exposición contra su sesión 1, $p < 0.05$

% Diferencia del grupo Exposición contra su sesión 5, $p < 0.05$

& Diferencia del grupo No regulada contra su sesión 1, $p < 0.05$

\$ Diferencia del grupo No regulada contra su sesión 10, $p < 0.05$

a Diferencia del grupo Regulada contra su sesión 1, $p < 0.05$

4.3.4. *D* de Cohen.

De la misma manera que en el Experimento 2, se realizó el análisis de Cohen para conocer la magnitud de cambio en la intensidad de señal del cerebro de la rata hembra.

4.3.4.1. Cópula no regulada por la hembra

En congruencia con los resultados por *Roís*, la magnitud de cambio en la intensidad de señal se observa en la sesión 5 del grupo de cópula no regulada por la hembra cuando se compara con su sesión 1 (Figura 28), presentando valores en su mayoría de .8, que es considerado una magnitud de cambio mayor. Regiones del circuito de recompensa mostraron valores mayores (*D* de Cohen >1), como lo es el cuerpo estriado, núcleo accumbens y el hipocampo; las regiones del circuito socio-sexual, como el núcleo de la cama de la estría terminal, el área preóptica medial, la amígdala y el hipotálamo ventromedial mostraron valores cercanos a 1.5. Regiones de la corteza como la corteza motora y somato sensorial mostraron cambios similares.

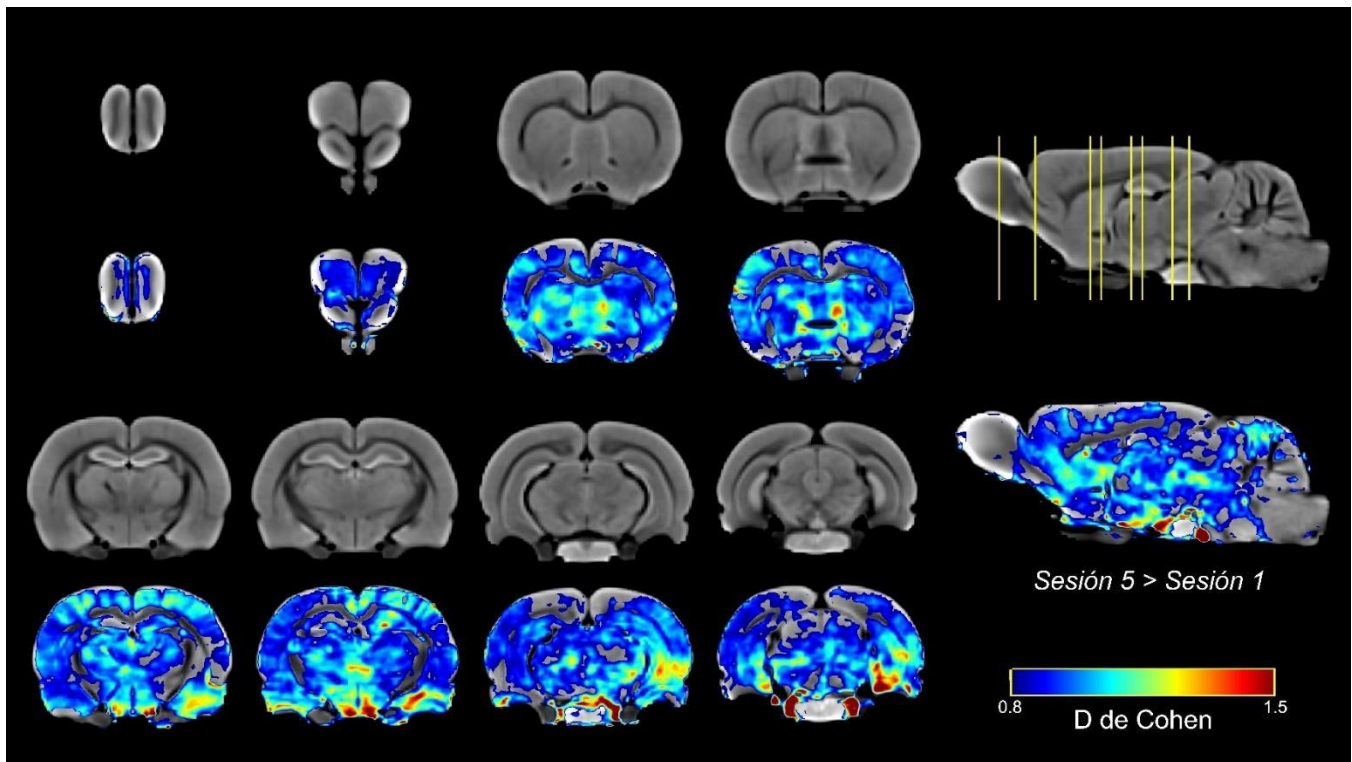


Figura 28. Mapas del tamaño del efecto de las diferencias en actividad neuronal entre sesiones 1 y 5 del grupo CNR. Resultados del análisis de la D de Cohen en la comparación de la sesión 5 del grupo de cópula no regulada por la hembra contra su sesión 1.

La comparación de la sesión 10 contra la sesión 1 mostró que hay un mayor cambio en la intensidad de señal de la sesión 10 respecto a la 1 (Figura 29), pero menores en comparación con los resultados de la sesión 5 respecto a la sesión 1. El bulbo olfatorio es la región que conservó una magnitud de cambio grandes comparado con regiones del circuito de recompensa o regiones de la corteza cerebral.

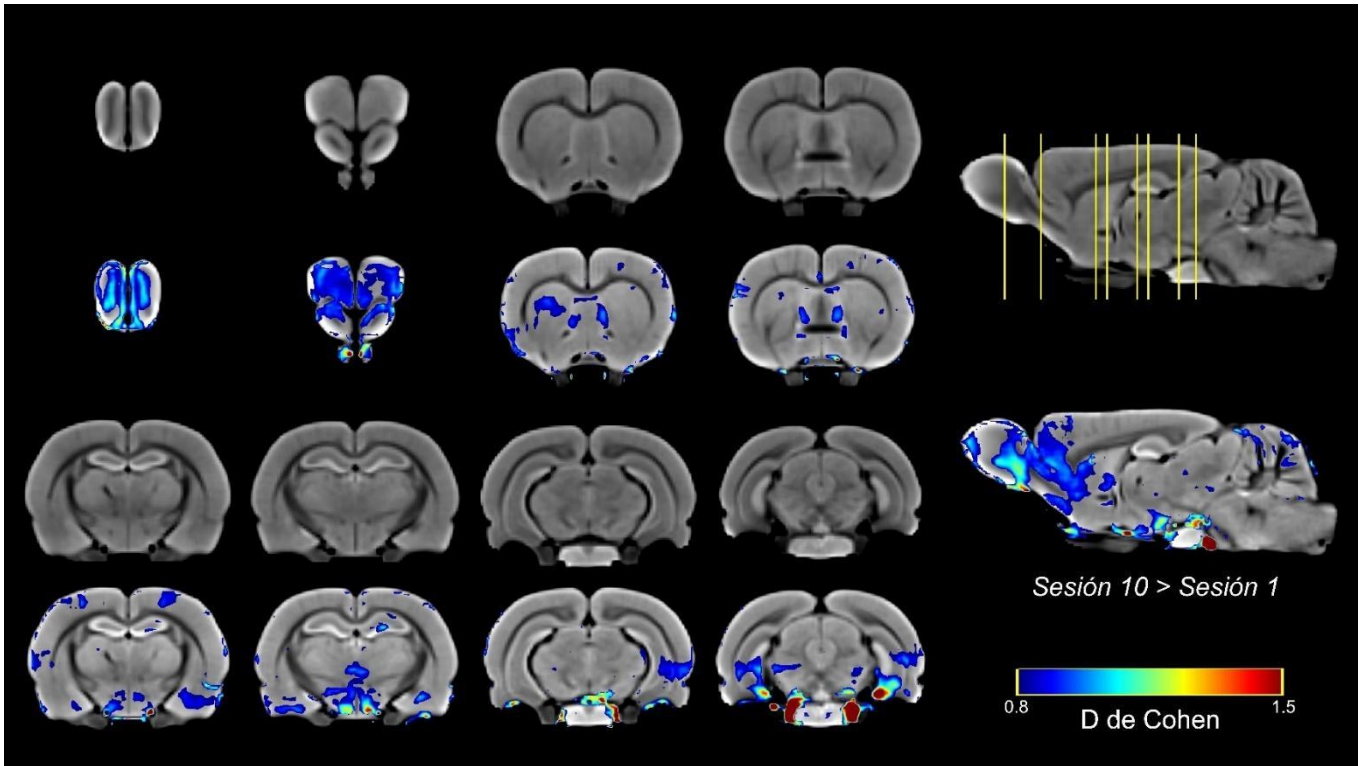


Figura 29. Mapas del tamaño del efecto de las diferencias en actividad neuronal entre sesiones 1 y 10 del grupo CNR. Resultados del análisis de la D de Cohen en la comparación de la sesión 10 del grupo de cópula no regulada por la hembra contra su sesión 1.

4.3.4.2. Cópula regulada por la hembra

Al comparar las imágenes de las sesiones 1, 5 y 10 del grupo de cópula regulada por la hembra, fue en la comparación de la sesión 5 respecto a la 1 donde se encontraron resultados (Figura 30). Los valores de la D de Cohen fueron casi en su totalidad de 1.5, indicando que los cambios fueron más homogéneos que con el grupo de cópula no regulada por la hembra. Regiones de los circuitos de recompensa y socio-sexual mostraron una magnitud de cambio de 1.5. De forma similar que el grupo de cópula no regulada, áreas de la corteza motora y somato sensorial mostraron valores superiores a 1.

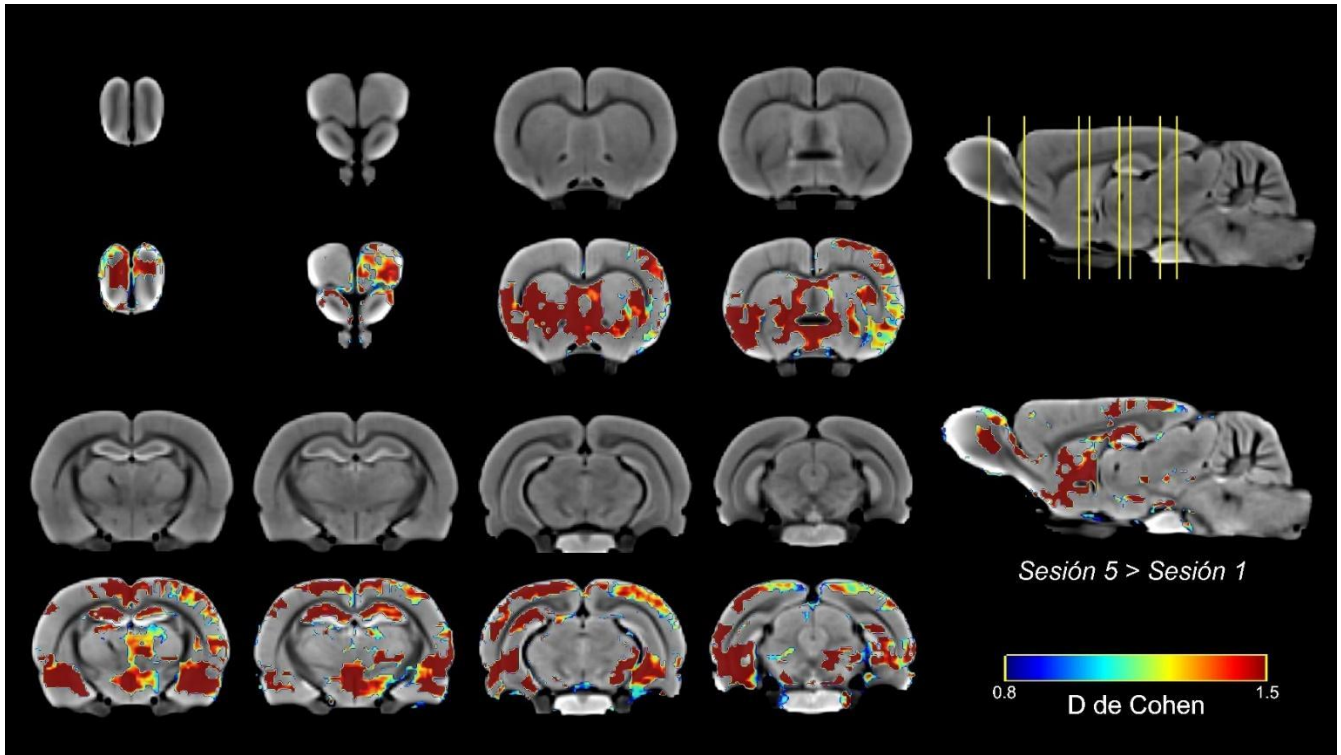


Figura 30. Mapas del tamaño del efecto de las diferencias en actividad neuronal entre sesiones 1 y 5 del grupo CR. Resultados del análisis de la D de Cohen en la comparación de la sesión 5 del grupo de cópula regulada por la hembra contra su sesión 1.

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

Los resultados del Experimento 1 demostraron que las dosis de cloruro de manganeso empleadas no generaron alteraciones en la conducta sexual de las hembras. Los datos de conducta sexual de los 3 grupos (salina, 8 y 16 mg/kg) no presentaron diferencias significativas en los parámetros de conducta sexual, donde los indicadores de receptividad sexual (la intensidad media de lordosis y el cociente de lordosis) se mantienen altos y similar entre los grupos a lo largo de las 10 sesiones. No existen trabajos previos donde se evalúa el efecto de la administración de cloruro de manganeso en el desempeño sexual de la rata hembra, por lo que estos datos ayudan a determinar el alcance de las dosis empleadas para futuros trabajos conductuales.

De forma similar, los resultados de la rueda de ejercicio mostraron que la administración de cloruro de manganeso no reduce el desempeño locomotor en las sesiones 1, 5 o 10 de las hembras. Estudios realizados por Eschenko en 2010 demostraron que la dosis de 16 mg/kg reduce el desempeño motor en la rueda de ejercicio en machos, pero no se había demostrado el efecto en las hembras. Los resultados obtenidos fueron diferentes a los reportados por Eschenko: las hembras con el tratamiento de cloruro de manganeso no corrieron menos que las controles y en algunas sesiones (6, 8 y 9) los grupos corrieron más que las controles. Una posible causa de por qué los resultados de las hembras difieren de los machos podrían responderse con los trabajos realizados por Lee y colaboradores (E Lee, Sidoryk-Wegrzynowicz, Farina, Rocha, & Aschner, 2013; ES Lee, Yin, Milatovic, Jiang, & Aschner, 2009), donde demostraron en cultivos celulares que el estradiol tiene funciones protectoras contra el manganeso, reduciendo los efectos tóxicos que este produce en los astrocitos y las neuronas. A pesar de que los resultados son en cultivo celular, los efectos tóxicos conductuales pueden estar altamente relacionados con el deterioro en la función de los astrocitos y neuronas en el sistema nervioso central. Nosotros usamos 25 µg de benzoato de estradiol para inducir la receptividad sexual en las ratas hembra, pero puede ser que indirectamente

evitemos los efectos tóxicos del manganeso al administrar el benzoato de estradiol, pero será necesario hacer estudios histológicos para confirmarlo.

El Rotarod ha sido utilizado para identificar alteraciones motoras (Hamm, Pike, O'Dell, Lyeth, & Jenkins, 1994). Con los resultados obtenidos, pudimos confirmar que no se alteró la motricidad fina en los grupos experimentales. No hay reportes previos sobre el efecto de la administración de cloruro de manganeso en la motricidad fina de la rata hembra. Peres y colaboradores demostraron que la administración de 20 mg/kg de $MnCl_2$ en los días posnatales 8-12 reduce la latencia de caída cuando se evalúa al día posnatal 65 (Peres et al., 2015). Esto nos indica que dosis altas de $MnCl_2$ pueden afectar de forma permanente la motricidad fina del individuo cuando este se encuentra en desarrollo. Se desconoce si estos efectos son similares en hembras intactas (sin ovariectomizar) y que sucede si se administra estradiol en la etapa adulta. Los datos de la prueba de Friedman para medidas repetidas indican que no hay efectos a largo plazo de las dosis utilizadas, por lo que la falta de alteraciones conductuales que decrementen el desempeño demuestra que el tratamiento utilizado es seguro para realizar experimentos longitudinales sin presentar alteraciones conductuales a corto, mediano o largo plazo.

En el Experimento 2, a pesar de que se observaron cambios en los parámetros de porcentaje de salida después de la intromisión, este dato es reflejo que las hembras aprendieron a regular los contactos copulatorios, incrementando el porcentaje de salidas después de una intromisión en las sesiones 5 y 10 en comparación con la sesión 1 de ambos grupos. El regular de forma adecuada los contactos copulatorios es resultado de la experiencia adquirida por la hembra, siendo esta la que lleva el control de la cópula. Ya se conoce que el regular la cópula induce estados afectivos positivos (Paredes & Alonso, 1997) e induce cambios plásticos en hembras (Alvarado-Martínez & Paredes, 2018; Erskine & Hanrahan, 1997). Estos resultados son congruentes con los resultados obtenidos de las imágenes de resonancia magnética, donde en las semanas 5 y 10 encontramos un incremento de la intensidad de señal en los circuitos de recompensa y socio-sexual. Esto indica que

el adquirir la habilidad de regular los contactos copulatorios incrementó la actividad neuronal en estos circuitos, acumulando más manganeso e incrementando la señal en estas regiones. Una forma de descartar que los cambios de la señal son debido a la acumulación de las dosis es que la intensidad de señal del grupo control permaneció estable durante las 3 sesiones de escaneo, indicando que no existen alteraciones de intensidad de señal causadas por el efecto de dosis anteriores. En este experimento hay un periodo de espera de 4 semanas entre inyecciones de $MnCl_2$, lo cual permite la eliminación completa de la sustancia, evitando cambios de intensidad de señal que no sea resultado de las pruebas conductuales.

Los resultados obtenidos de estos dos primeros experimentos nos ayudaron a determinar la dosis que no causa alteraciones motoras y conductuales a las hembras y que produce una señal adecuada para experimentos longitudinales, siendo la dosis de 16 mg/kg la dosis a elegir para futuros experimentos. Además, con los datos obtenidos nos permitió explorar el realizar experimentos conductuales de 60 minutos, comparados con los experimentos de 30 minutos que hicimos en los experimentos anteriores. Al incrementar el tiempo de las pruebas de conducta sexual las hembras generarán más experiencia en menor tiempo. Este cambio ayudará a identificar cambios plásticos a mayor plazo resultado de la experiencia sexual.

El grupo de exposición a macho mostró un incremento de intensidad de señal hasta la sesión 10 en las regiones del NCET, la amígdala y el APOM. El NCET se encarga del reconocimiento de sujetos de su misma especie; la activación de la amígdala y el APOM pudo ser causada porque las hembras se encontraban receptivas sexualmente, y al sentir al macho sexualmente experto, esto pudo generar la activación de estas áreas, preparándolas para la ejecución de la conducta sexual. El hecho que la sesión 10 fuera donde se encuentra el pico de actividad puede deberse a que la estimulación visual y quimiosensorial generan una activación neuronal paulatina comparada con la estimulación somatosensorial, específicamente la vaginocervical. Lo cual nos hace inferir que, a pesar de ser

presentado el estímulo con anterioridad, este no dejó de ser relevante para las hembras. Esto puede deberse a que los aspectos apetitivos de la conducta sexual no sólo se mantuvieron, sino que respondían con mayor eficiencia conforme se incrementaba la exposición al estímulo, incrementándose de forma gradual el número de neuronas activas conforme avanzaba el experimento. A pesar de mostrar una tendencia en incremento, la intensidad de señal del bulbo olfatorio no mostró diferencias significativas a lo largo de las sesiones. Esto puede indicar que, a pesar de no incrementar de forma significativa, la actividad del bulbo olfatorio fue suficiente para enviar señales y activar al APOM.

Existen trabajos que han demostrado la actividad medida por MEMRI después de presentarse diversos estímulos olfativos (Chuang et al., 2010; Chuang, Lee, Silva, Belluscio, & Koretsky, 2009). Pero este es el primer reporte de la activación evaluada por MEMRI de estímulos sexualmente relevantes. Además, cabe mencionar las diferencias entre el estudio de Chuang y colaboradores y los del presente trabajo: en el trabajo de Chuang y colaboradores se presentó el estímulo olfativo al tiempo que se realizaba el escaneo mientras que con nosotros (como lo fue con todos los estímulos de los grupos experimentales) se presentó el estímulo y después se realizó el escaneo; el campo de visión (*FOV, field of view*, por sus siglas en inglés) se limitó al bulbo olfatorio, permitiendo identificar la actividad de capas específicas del bulbo olfatorio y patrones diferenciales de actividad, mientras que nuestras imágenes, al escanear de forma global, se perdió resolución espacial de capas o subnucleos; la administración de manganeso fue vía nasal, por lo que la biodisponibilidad del manganeso fue más rápida que con una administración periférica, pero con la desventaja que la mayoría del manganeso se absorbería en las zonas anteriores, reduciendo la disposición en las regiones posteriores, además que el propósito de este trabajo fue explorar la actividad de más regiones cerebrales; la dosis utilizada por Chuang y colaboradores (2010) fue de 60 mg/kg, que en su caso no evaluaban ningún tipo de actividad locomotora, mientras que en nuestros experimentos era necesario que el desempeño motor de las hembras no se viera afectado. Los resultados individuales de las regiones del circuito de

recompensa no se mostraron cambios en la intensidad de señal, lo que podría indicar que mientras que si se activan áreas del circuito socio-sexual que involucran los aspectos apetitivos, sea necesaria el acto consumatorio para activar de forma individual cada una de estas regiones.

El grupo de cópula no regulada mostró una intensidad de señal mayor en la sesión 5 respecto a su sesión 1 en el bulbo olfatorio, el NCET, la amígdala y el APOM. El incremento de actividad en esta sesión podría indicar que después de esta sesión, estaría sucediendo un proceso de especialización, donde no es necesario un gran número de células activas, teniendo un trabajo más eficiente requiriendo un menor número de células para obtener el mismo resultado conductual. El grupo de cópula regulada por la hembra mostró mayor actividad en la sesión 5 respecto a su sesión 1 en el NCET, la amígdala, el APOM y el HVM. De la misma manera que el grupo de cópula no regulada por la hembra, esto nos puede indicar que el punto mayor de actividad en la sesión 5 sea previo al proceso de especialización, donde se requiere menor cantidad de neuronas activas para producir el mismo efecto conductual. Las hembras que copularon (regulando o no los contactos copulatorios) mostraron un pico de intensidad de señal en la sesión 5, tanto en las regiones del circuito socio-sexual como en el de recompensa. Dato que respalda los resultados del Experimento 2, debido a que la décima sesión era el equivalente a 5 horas de experiencia en conducta sexual. Esto nos puede indicar que será el tiempo de exposición lo que facilita el incremento de actividad neuronal, lo que ayudaría a establecer protocolos donde se busque tener menos sesiones, pero con mayor tiempo de exposición al tratamiento.

Al integrar los datos de las regiones del circuito socio-sexual y de recompensa muestran que la intensidad de señal es mayor en la sesión 5 con respecto a la sesión 1, pero también respecto a la sesión 10, indicando una caída significativa de la señal en los grupos que copularon. Esto nos indica que hay un proceso de adaptación en el que es suficiente una menor activación neuronal para obtener la respuesta esperada. Es necesario indagar qué otros procesos plásticos podrían

estar sucediendo a consecuencia de la experiencia en la conducta sexual y de los propios cambios plásticos causados por la misma.

El análisis de la D de Cohen de la señal global del cerebro corroboró que la sesión 5 fue la que presentó mayor activación cerebral en los grupos que copularon. A pesar de mostrar cambios mayores en la magnitud de cambio ($d > .8$), se pueden identificar diferencias en el patrón de actividad de ambos grupos. El grupo de cópula no regulada por la hembra muestra que la magnitud de cambio sucedió en áreas corticales como subcorticales, donde las regiones con mayor valor ($d = 1.5$) son regiones del circuito socio-sexual y de recompensa. Por otro lado, la magnitud de cambio del grupo de cópula regulada por la hembra, a pesar de no ser tan amplia como lo fue en el grupo de cópula no regulada, fue consistentemente mayor en las regiones activas ($d = 1.5$). Por lo que este análisis nos ayuda a corroborar que la cópula regulada por la hembra, esta actividad genera cambios cerebrales en la hembra más intensos que cuando la hembra no los regula.

Estos son los primeros resultados que nos muestran los cambios plásticos a largo plazo resultado de diferentes tipos de condiciones y estímulos sexuales en la rata hembra, indicando que existe activación diferencial de las áreas del cerebro pertenecientes a los circuitos de recompensa y socio-sexual dependientes de la duración y tipo de estimulación sexual, siendo la técnica MEMRI una herramienta adecuada para la identificación de estos patrones de actividad cerebral.

Este es el primer estudio donde se pueden identificar estas diferencias de activación neuronal a largo plazo en todo el cerebro de ratas que copularon, sirviendo de parteaguas para futuros protocolos donde se busque identificar la activación cerebral inducida por diferentes conductas. El uso de MEMRI en modelos longitudinales ayudará a no solo identificar cambios respecto a un sujeto control, además ayuda a tener una visión amplia de los cambios que suceden a lo largo del tiempo en los sujetos experimentales.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado-Martínez, R., & Paredes, R. G. (2018). Incorporation of new neurons in the olfactory bulb after paced mating in the female rat. *Behavioral Brain Research*, *343*, 95-101.
- Aoki, I., Wu, Y.-J. L., Silva, A. C., Lynch, R. M., & Koretsky, A. P. (2004). In vivo detection of neuroarchitecture in the rodent brain using manganese-enhanced MRI. *NeuroImage*, *22*, 1046-1059.
- Arzate, D. M., Portillo, W., Corona, R., & Paredes, R. G. (2013). Repeated paced mating promotes the arrival of more newborn neurons in the main and accessory olfactory of adult female rats. *Neuroscience Letters*, *232*, 151-160.
- Asaba, A., Hattori, T., Mogi, K., & Kikusui, T. (2014). Sexual attractiveness of male chemicals and vocalizations in mice. *Frontiers in Neuroscience*, *8*(231), 1-13.
- Bedos, M., Portillo, W., & Paredes, R. G. (2018). Neurogenesis and sexual behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology*. Retrieved from doi:<https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2018.02.004>
- Boretius, S., & Frahm, J. (2011). Manganese-Enhanced Magnetic Resonance Imaging. In L. Schroder & C. Faber (Eds.), *In Vivo NMR Imaging. Materials and methods* (pp. 531-568). New York: Humana Press.
- Carlson, N. R. (2013). Female Reproductive Behavior. In J. Mosher (Ed.), *Physiology of Behavior* (pp. 323-358). Amherst: Pearson.
- Corona, R., Retana-Márquez, S., Portillo, W., & Paredes, R. G. (2016). Sexual behavior increases cell proliferation in the rostral migratory stream and promotes the differentiation of the new cells into neurons in the accessory olfactory bulb of female rats. *Frontiers in Neuroscience*, *10*(48), 1-15.
- Chuang, K.-H., Belluscio, L., & Koretsky, A. P. (2010). In vivo detection of individual glomeruli in the rodent olfactory bulb using manganese enhanced MRI. *NeuroImage*, *49*, 1350-1356.
- Chuang, K.-H., Lee, J. H., Silva, A. C., Belluscio, L., & Koretsky, A. P. (2009). Manganese enhanced MRI reveals functional circuitry in response to odorant stimuli. *NeuroImage*, *44*, 363-372.
- De Pasqual, C., Groot, A. T., Mappes, J., & Burdfield-Steel, E. (2021). Evolutionary importance of intraspecific variation in sex pheromones. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Trends Ecol Evol*, *36*(9), 848-859. doi: 10.1016/j.tree.2021.05.005
- Donner, N. C., & Lowry, C. A. (2013). Sex differences in anxiety and emotional behavior. [Review]. *Pflugers Arch*, *465*(5), 601-626. doi: 10.1007/s00424-013-1271-7
- Erskine, M. S. (1989). Solicitation behavior in the estrous female rat: a review. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. *Horm Behav*, *23*(4), 473-502. doi: 10.1016/0018-506x(89)90037-8
- Erskine, M. S., & Baum, M. J. (1982). Effects of paced coital stimulation on termination of estrus and brain indoleamine levels in female rats. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Pharmacol Biochem Behav*, *17*(4), 857-861. doi: 10.1016/0091-3057(82)90373-2
- Erskine, M. S., & Hanrahan, S. B. (1997). Effects of paced mating on c-fos gene expression in the female rat brain. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Neuroendocrinol*, *9*(12), 903-912. doi: 10.1046/j.1365-2826.1997.00660.x
- Erskine, M. S., Kornberg, E., & Cherry, J. A. (1989). Paced copulation in rats: effects of intromission frequency and duration on luteal activation and estrus length. *Physiol Behav*, *45*(1), 33-39. doi: 10.1016/0031-9384(89)90163-7

- Eschenko, O., Canals, S., Simanova, I., Beyerlein, M., Murayama, Y., & Logothetis, N. K. (2010a). Mapping of functional brain activity in freely behaving rats during voluntary running using manganese-enhanced MRI: Implication for longitudinal studies. *NeuroImage*, *49*, 2544-2555.
- Eschenko, O., Canals, S., Simanova, I., Beyerlein, M., Murayama, Y., & Logothetis, N. K. (2010b). Mapping of functional brain activity in freely behaving rats during voluntary running using manganese-enhanced MRI: implication for longitudinal studies. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *NeuroImage*, *49*(3), 2544-2555. doi: 10.1016/j.neuroimage.2009.10.079
- Georgescu, M., & Pfaus, J. G. (2006). Role of glutamate receptors in the ventromedial hypothalamus in the regulation of the female rat sexual behaviors I. Behavioral effects of glutamate and its selective receptor agonists AMPA, NMDA and kainate. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *83*, 322-332.
- Georgescu, M., Sabongui, C., Corpo, A. D., Marsan, L., & Pfaus, J. G. (2009). Vaginal stimulation induces Fos in glutamate neurons in the ventromedial hypothalamus: Attenuation by estrogen and progesterone. *Hormones and Behavior*, *56*, 450-456.
- González-Flores, O., Hoffman, K. L., Delgadillo, J. A., Keller, M., & Paredes, R. G. (2017). 1.02 - Female Sexual Behavior in Rodents, Lagomorphs, and Goats. In D. W. Pfaff & M. Joëls (Eds.), *Hormones, Brain and Behavior (Third Edition)* (Vol. 1, pp. 59-82): Academic Press. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803592-4.00002-X>.
- Hamm, R. J., Pike, B. R., O'Dell, D. M., Lyeth, B. G., & Jenkins, L. W. (1994). The rotarod test: An evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*, *11*(2), 187-196.
- Hardy, D. F., & Debold, J. F. (1971). Effects of mounts without intromission upon the behavior of female rats during the onset of estrogen-induced heat. *Physiol Behav*, *7*(4), 643-645. doi: 10.1016/0031-9384(71)90120-x
- Hennessey, A. C., Camak, L., Gordon, F., & Edwards, D. A. (1990). Connections between the pontine central gray and the ventromedial hypothalamus are essential for lordosis in female rats. *Behavioral Neuroscience*, *104*(3), 477-488.
- Jasanoff, A. (2005). Functional MRI using molecular imaging agents. *TRENDS in Neurosciences*, *28*(3), 120-126.
- Kuo, Y.-T., Herlihy, A. H., So, P.-W., & Bell, J. D. (2006). Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI) without compromise of the blood-brain barrier detects hypothalamic neuronal activity in vivo. *NMR Biomedicine*(19), 1028-1034.
- Lee, E., Sidoryk-Wegrzynowicz, M., Farina, M., Rocha, J. B., & Aschner, M. (2013). Estrogen attenuates manganese-induced glutamate transporter impairment in rat primary astrocytes. [Research Support, N.I.H., Extramural]. *Neurotox Res*, *23*(2), 124-130. doi: 10.1007/s12640-012-9347-2
- Lee, E., Yin, Z., Milatovic, D., Jiang, H., & Aschner, M. (2009). Estrogen and tamoxifen protect against Mn-induced toxicity in rat cortical primary cultures of neurons and astrocytes. [Research Support, N.I.H., Extramural]
- Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. *Toxicol Sci*, *110*(1), 156-167. doi: 10.1093/toxsci/kfp081
- Lin, Y.-J., & Koretsky, A. P. (1997). Manganese ion enhances T1-Weighted MRI during brain activation: An approach to direct imaging of brain function. *MRM*, *38*, 378-388.
- McRobbie, D. W., Moore, E. A., Graves, M. J., & Prince, M. R. (2006). MRI. From picture to proton D. W. McRobbie, E. A. Moore, M. J. Graves & M. R. Prince (Eds.),
- Micevych, P. E., Mermelstein, P. G., & Sinchak, K. (2017). Estradiol membrane-initiated signaling in the brain mediates respiration. *Trends in Neuroscience*, *40*(11), 654-666.

- Mildvan, A. S., & Cohn, M. (1963). Magnetic resonance studies of the interaction of the manganous ion with bovine serum albumin. *Biochemistry*, 2(5), 910-919.
- Nelson, R. J., & Kriegsfeld, L. J. (2017). Female Reproductive Behavior *An Introduction to Behavioral Endocrinology* (Fifth ed., pp. 275-234). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- O'Connell, L. A., & Hofmann, H. A. (2012). Evolution of a vertebrate social decision-making network. [Research Support, Non-U.S. Gov't
Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. *Science*, 336(6085), 1154-1157. doi: 10.1126/science.1218889
- O'Connell, L. A., & Hofmann, H. A. (2011). The vertebrate mesolimbic reward system and social behavior network: A comparative synthesis. *The Journal of Comparative Neurology*, 519, 3599-3639.
- Parada, M., Chamas, L., Censi, S., Coria-Avila, G., & Pfau, J. G. (2010). Clitoral stimulation induces conditioned place preference and Fos activation in the rat. *Hormones and Behavior*, 57, 112-118.
- Paredes, R. (2003). Medial preoptic area/anterior hypothalamus and sexual motivation. [Research Support, Non-U.S. Gov't
Review]. *Scand J Psychol*, 44(3), 203-212. doi: 10.1111/1467-9450.00337
- Paredes, R., & Alonso, A. (1997). Sexual behavior regulated (paced) by the female induces conditioned place preference. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Behav Neurosci*, 111(1), 123-128. doi: 10.1037//0735-7044.111.1.123
- Paredes, R., & Gusati, A. F. (2008). Rewarding properties of mating. In M. M. Ubach & R. Mondragón-Ceballos (Eds.), *Neural Mechanisms of Action of Drugs of Abuse and Natural Reinforcers* (pp. 159-170). India: Research Signpost.
- Paredes, R., & Vazquez, B. (1999). What do female rats like about sex? Paced mating. *Behavioural Brain Research* 105, 117-127.
- Peres, T. V., Eyng, H., Lopes, S. C., Colle, D., Goncalves, F. M., Venske, D. K., . . . Leal, R. B. (2015). Developmental exposure to manganese induces lasting motor and cognitive impairment in rats. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Neurotoxicology*, 50, 28-37. doi: 10.1016/j.neuro.2015.07.005
- Pfaff, D. W., & Sakuma, Y. (1979). Facilitation of the lordosis reflex of female rats from the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Physiol*, 288, 189-202.
- Pfau, J. G., Jones, S. L., Flanagan-Cato, L. M., & Blaustein, J. D. (2015). Female sexual behavior. In T. M. Plant & A. J. Zeleznik (Eds.), *Reproductive behavior and its control* (Fourth ed., Vol. 2, pp. 2287-2370): Academic Press.
- Pfau, J. G., Kippin, T. E., & Coria-Avila, G. A. (2003). What can animal models tell us about human sexual response? *Annual Review of Sex Research*, 14, 1-63.
- Pohmann, R. (2011). Physical basics of NMR. In L. Schroder & C. Faber (Eds.), *In Vivo NMR Imaging. Materials and methods* (pp. 3-22). New York: Humana Press.
- Portillo, W., Nuñez, M., Paredes, R. G., & Bedos, M. (2019). Neurobiology of reproductive behavior, the role of neurogenesis In J. C. Choe (Ed.), *Encyclopedia of Animal Behavior* (Vol. 4, pp. 274-282). Seoul, Korea: Academic Press.
- Portillo, W., & Paredes, R. G. (2019). Motivational Drive in Non-copulating and Socially Monogamous Mammals. *Front Behav Neurosci*, 13, 238. doi: 10.3389/fnbeh.2019.00238
- Rowe, D. W., & Erskine, M. S. (1993). c-Fos proto-oncogene activity induced by mating in the preoptic area, hypothalamus and amygdala in the female rat: role of afferent input via the

- pelvic nerve. [Comparative Study]. *Brain Res*, 621(1), 25-34. doi: 10.1016/0006-8993(93)90294-w
- Santoyo-Zedillo, M., Portillo, W., & Paredes, R. G. (2017). Neurogenesis in the olfactory bulb induced by paced mating in the female rat is opioid dependent. *Plos One*, 12(11), 1-13.
- Shukakidze, A., Lazriev, I., & Mitagvariya, N. (2003). Behavioral impairments in acute and chronic manganese poisoning in white rats. [Comparative Study]. *Neurosci Behav Physiol*, 33(3), 263-267. doi: 10.1023/a:1022103415424
- Silva, A. C., Lee, J. H., Aoki, I., & Koretsky, A. P. (2004). Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI): methodological and practical considerations. *NMR in Biomedicine*, 17, 532-543.
- Sullivan, G. M., & Feinn, R. (2012). Using Effect Size-or Why the P Value Is Not Enough. *J Grad Med Educ*, 4(3), 279-282. doi: 10.4300/JGME-D-12-00156.1
- Takeda, A., Kodama, Y., Ishiwatari, S., & Okada, S. (1998). Manganese transport in the neural circuit of rat CNS. *Brain Research Bulletin*, 45(2), 149-152.
- Treuting, P. M., & Jr., T. H. M. (2012). Oral cavity and teeth. In P. M. Treuting & S. M. Dintzis (Eds.), *Comparative anatomy and histology. A mouse and human atlas* (pp. 95-110): Academic Press.
- Uludag, K., Dubowitz, D. J., & Buxton, R. B. (2005). Basic Principles of functional MRI. *Clinical MRI*, 250-283.
- Zubcevic, J., Watkins, J., Perez, P. D., Colon-Perez, L. M., Long, M. T., Febo, M., & Hayward, L. (2017). MEMRI reveals altered activity in brain regions associated with anxiety, locomotion, and cardiovascular reactivity on the elevated plus maze in the WKY vs SHR rats. *Brain Imaging and Behavior*.

RESEARCH ARTICLE

Brain circuits activated by female sexual behavior evaluated by manganese enhanced magnetic resonance imaging

Alejandro Aguilar-Moreno¹, Juan Ortiz¹, Luis Concha¹, Sraeal Alcauter¹, Raúl G. Paredes^{1,2*}

1 Instituto de Neurobiología, UNAM, Campus Juriquilla, Querétaro, México, **2** Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad Juriquilla, UNAM, Querétaro, México

* rparedes@unam.mx



Abstract

Magnetic resonance imaging (MRI) allows obtaining anatomical and functional information of the brain in the same subject at different times. Manganese-enhanced MRI (MEMRI) uses manganese ions to identify brain activity, although in high doses it might produce neurotoxic effects. Our aims were to identify a manganese dose that does not affect motivated behaviors such as sexual behavior, running wheel and the rotarod test. The second goal was to determine the optimal dose of chloride manganese ($MnCl_2$) that will allow us to evaluate activation of brain regions after females mated controlling (pacing) the sexual interaction. To achieve that, two experiments were performed. In experiment 1 we evaluated the effects of two doses of $MnCl_2$, 8 and 16 mg/kg. Subjects were injected with one of the doses of $MnCl_2$ 24 hours before the test on sessions 1, 5 and 10 and immediately thereafter scanned. Female sexual behavior, running wheel and the rotarod were evaluated once a week for 10 weeks. In experiment 2 we followed a similar procedure, but females paced the sexual interaction once a week for 10 weeks and were injected with one of the doses of $MnCl_2$ 24 hours before the test and immediately thereafter scanned on sessions 1, 5 and 10. The results of experiment 1 show that neither dose of $MnCl_2$ induces alterations on sexual behavior, running wheel and rotarod. Experiment 2 demonstrated that MEMRI allow us to detect activation of different brain regions after sexual behavior, including the olfactory bulb (OB), the bed nucleus of the stria terminalis (BNST), the amygdala (AMG), the medial preoptic area (MPOA), the ventromedial hypothalamus (VMH), the nucleus accumbens (NAcc), the striatum (STR) and the hippocampus (Hipp) allowing the identification of changes in brain circuits activated by sexual behavior. The socio sexual circuit showed a higher signal intensity on session 5 than the reward circuit and the control groups indicating that even with sexual experience the activation of the reward circuit requires the activation of the socio sexual circuit. Our study demonstrates that MEMRI can be used repeatedly in the same subject to evaluate the activation of brain circuits after motivated behaviors and how can this activation change with experience.

OPEN ACCESS

Citation: Aguilar-Moreno A, Ortiz J, Concha L, Alcauter S, Paredes RG (2022) Brain circuits activated by female sexual behavior evaluated by manganese enhanced magnetic resonance imaging. *PLoS ONE* 17(8): e0272271. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272271>

Editor: Juan M. Dominguez, University of Texas at Austin, UNITED STATES

Received: April 26, 2022

Accepted: July 15, 2022

Published: August 1, 2022

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272271>

Copyright: © 2022 Aguilar-Moreno et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its [Supporting Information files](#).

Funding: This research was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, PAPIIT), Universidad Nacional Autónoma de México (Grant: DGAPA, PAPIIT, UNAM, IN206521). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Sexual behavior (SB) is a motivated behavior that is fundamental for the survival of species. It is an innate behavior that can be triggered by hormones and chemo sexually relevant olfactory cues (pheromones) from conspecifics of the opposite sex. When a sexually receptive female rat is exposed to a male rat, the sexually relevant olfactory cues of the male are detected through the olfactory system of the female. Under appropriate conditions, the female will display proceptive behaviors including hopping, darting and ear wiggling to attract the attention of the male. In response to a male mount the female will display a lordosis response to facilitate copulation [1].

Classic studies have shown that when females control or pace the sexual interaction it has positive effects in reproduction, increasing the probability of pregnancy and having a higher number of pups in the offspring compared to females that do not pace the sexual interaction [1, 2]. Paced mating also induces a reward state assuring that the behavior will be repeated in the future [3, 4]. It is also well established that paced mating induces neurogenesis in the subventricular zone (SVZ), rostral migratory stream (RMS), olfactory bulb system (OB) and the hippocampus indicating that this motivated behavior induces permanent brain plastic changes [5, 6].

The olfactory bulbs are part of a well identify circuit involved in the control of sexual behavior in rodent species. Pheromones are preferentially detected by the vomeronasal organ, which send its axons to the accessory olfactory bulb (AOB). From here, mitral cells project to the medial amygdala (AMG) which in turn projects to the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) and the medial preoptic area (MPOA). The importance of this circuit in the control of reproduction including sexual behavior is well established [7, 8]. Other techniques such as hormone implants, lesions or immediate early gene expression have also demonstrated the importance of these brain regions in the control of sexual behavior. For example, the FOS protein was increased in the BNST, VMH and medial amygdala after sexually receptive females received vaginocervical stimulation [9]. A similar increase in FOS was observed in the BNST, the MPOA and the ventromedial hypothalamus (VMH) in females after receiving intromissions, compared to home-cage females [10]. Moreover, paced mating induced a higher FOS expression in the brain regions described above in comparison to females that do not paced the sexual interaction [11]. One of the limitations associated with some of the techniques used to identify the role of brain regions in the control of sexual behavior is that the animals need to be sacrificed after the behavior, for example to evaluate FOS expression [10]. The use of neuroimaging techniques allows us to test the same animal repeatedly and evaluate possible brain changes associated with experience in the same subject.

Magnetic resonance imaging (MRI) is a powerful technique that provides anatomical and functional brain information [12–14], being an excellent tool to perform longitudinal studies. MRI can measure anatomical and functional changes in the brain, including cortical thickness and brain neural activity [15–17]. Manganese-enhanced MRI (MEMRI) is a technique used as tracer of neural activity [16, 18–20]. MEMRI uses two characteristics of manganese: it is an analog of calcium, facilitating the entrance to depolarized cells through calcium voltage dependent channels [21]; and is a paramagnetic element, increasing MR contrast in T1 weighted images [13, 14, 22–24]. Hence, when the neurons are depolarized, the active cells increase T1 signal intensity by the accumulation of manganese. Therefore, the increase of signal intensity is related to the activation of neurons.

The first study to evaluate the functional properties of manganese was done by Lin & Koretsky [22]. Since then, MEMRI has been used in different animal models [17, 25–27] to evaluate brain circuits controlling different behaviors, using a wide range of doses, MR sequences

and image processing [18, 28–31]. It is well known that chloride manganese in high doses induce toxic effects, mainly in the motor skills of the subjects [25, 28–30, 32].

The aims of the present study were: 1) Find a dose of $MnCl_2$ that do not affect female sexual behavior, running wheel, and fine motor execution evaluated in the rotarod; 2) Identify the brain areas and/or circuits activated by female paced sexual behavior and determined if the activation is modified by sexual experience.

Methods

Subjects

Wistar female rats without sexual experience were used for this study. They were bilaterally ovariectomized (OVX) under anesthesia with a mixture of ketamine (95 mg/kg) and xylazine (12 mg/kg). Two weeks later and to induce sexual receptivity, OVX females received a subcutaneous (sc) injection of E2 benzoate (25 μ g/rat; Sigma St. Louis, Missouri, USA) and progesterone (1 mg/rat; Sigma), 48 and 4 hours respectively, before the behavioral test. These doses were used to induced high levels of sexual receptivity and we have used them repeatedly before [33, 34]. For Sexual behavior tests, sexually experienced males were used as stimulus. Experiments were approved by the Instituto de Neurobiología Animal Care Committee which follows NIH guidelines for the use and care of animals.

Experiment 1. The aim of experiment 1 was to assess possible behavioral alterations induced by repeated manganese chloride ($MnCl_2$) sc administration in female rats. Aside from testing the effects on sexual behavior we also evaluated the effects of $MnCl_2$ in another motivated behavior, running wheel, and a forced motor task, the rotarod test. We chose the lowest doses reported in the literature that enhance the MR signal [35]. In a pilot study we tried 3 doses: 8, 16 and 32 mg/kg of chloride manganese. However, the subjects injected with the 32 mg/kg dose showed severe skin lesions in the site of the injection and reduced activity in the behavioral tests. Therefore, this dose was suspended. The animals were divided in the following groups: Control, injected with saline 24 hours before the behavioral test (saline, $n = 9$). The 8 mg/kg ($n = 8$) and 16 mg/kg ($n = 9$) groups were injected with their corresponding dose of $MnCl_2$ 24 hours before the behavioral tests. We evaluated the subjects in the following tests:

Sexual Behavior Tests (SBT). Each female was placed in a mating cage (40x60x40 cm) of polycarbonate for 30 minutes. To allow the females to pace the sexual interaction with the male, a division with a whole (7x5 cm) in the center was placed in the middle of the cage, making possible only for the females to move between the two sides of the cage. The size of the hole is sufficient to allow the female, but not the male, to move freely from one compartment to the other pacing the sexual interactions. The subjects were tested once a week for 10 weeks with sexually experienced males, registering the following parameters: number of mounts (M), intromissions (I), and ejaculations (E); latency to the first mount (ML), intromission (IL), and ejaculation (EL); inter-intromission interval (III), percent of exits and the return latencies after mounts, intromissions, and ejaculations. The percentage of exits is obtained by determined the number of times the female exits the male compartment after a mount, intromission, or ejaculation in comparison to the total number of each stimulus received. While the return latencies are calculated by obtaining the mean time for the female to return to the male's chamber after an exit following a mount, an intromission, or an ejaculation. The mean lordosis intensity (MLI: 0, no lordosis; 1, medium lordosis; 2, full lordosis), and the lordosis quotient (LQ: number of lordosis display in response to a mount by the male, divided by the number of mounts and multiplied by 100) were calculated. The sexual behavior tests lasted 30 minutes. If the stimulus male rat did no display sexual behavior in the first 10 minutes, it was replaced by another male.

Running Wheel Test (RWT). Before the experiment, the females were trained in the running wheel in three sessions. The RW arena (LE904 76–0412, Panlab-Harvard Apparatus®) consist of a polycarbonate cage (42x26x19 cm, Allentown Caging Equipment) attached to a stainless-steel wheel activity (36x10 cm). A Multicounter (LE3806 Model) was used to record the number of turns, and the SEDACOM 2.0 (Panlab-Harvard Apparatus®) was used to export the data to a computer. The distance traveled was calculated using the circumference of the wheel (diameter * π , 0.36 m * 3.14 = 1.13 m) multiplied by the number of wheel turns (1.13 m * # of laps) and presented in meters (m). The duration of the RW training and test was 30 minutes for each session and subjects were tested once a week for 10 weeks immediately after the SBT.

Rotarod Test (RT). The Rotarod Test (IITC, Inc. Life Science, Series 8) was used to assess motor coordination. Females were habituated and trained in five sessions before testing due the complexity of the task. Females were placed on top of the apparatus (cylinders with 9.5 cm of diameter, 30 cm above the surface of the apparatus) and the rotarod was programmed in two modalities, Regular Speed (RS) and Increase Speed (IS). In the regular speed modality, the rotarod rotated at 10 rpm for 180 seconds. During the IS modality the rotarod started at 10 rpm, increasing the speed until 15 rpm for a total duration of 120 s, followed by 60 s in that speed until the end of the test. In both tests the latency to the first fall was registered and the test ended.

Chloride manganese (MnCl₂) administration. Chloride manganese (MnCl₂) (Manganese (II) chloride SIGMA-ALDRICH, Product number 244589, St. Louis) was dissolved in saline (MnCl₂mg/kg/10ml) and injected in doses of 8 or 16 mg/kg. In experiment 1 and 2, MnCl₂ was injected subcutaneously (sc) 24 hours before the behavioral evaluation [19] in weeks 1, 5 and 10. The doses were selected from previous studies [35].

Behavioral testing procedure. Subjects were tested once a week for 10 weeks. They were tested for sexual behavior in 30 minutes test, immediately followed by RW for 30 minutes and then the rotarod test (Fig 1). Twenty-four hours before sessions 1, 5 and 10 subjects were injected with saline, or 8 or 16 mg/kg of MnCl₂.

Experiment 2. Once we determined that the doses of MnCl₂ tested did not produce non-specific behavioral effects we evaluated the contrast in MR images in females that mated pacing the sexual interaction compared to females that did not mate. Another set of OVX females was divided into the following groups. Females that did not mate were injected with 8 (n = 13) or 16 (n = 13) mg/kg of MnCl₂; Females that mated pacing the sexual interaction injected with 8 (n = 13) or 16 (n = 13) mg/kg of MnCl₂. We followed a procedure similar to experiment 1. Subjects in the paced mating groups were tested once a week for 10 weeks for sexual behavior (Fig 2). Females from the control groups were placed alone in the mating cage. Twenty-four hours before sessions 1, 5 and 10 subjects were injected with 8 or 16 mg/kg of MnCl₂. The sexual behavior tests were done as described in experiment 1.

MEMRI data collection. After the behavioral tests, the females were taken to the Laboratorio Nacional de Imagenología por Resonancia Magnética (LANIREM) for small species. The animals were anesthetized with isoflurane (Sofloran® Vet) at 4% for induction and 1.5–2% during the scan time. To maintain body temperature, circulating hot water was distributed under the base where the animal was placed inside the scanner. Body temperature and breathing frequency was monitored throughout the scan. To obtain the images a 7 Tesla scan (BioScan Bruker® PharmaScan) was used, with a transmit-receive volume coil and a head holder with adjustable bite to position the animal in the center of the magnet. The sequence used was a T1 weighted fast low angle shot (T1FLASH) with the following parameters: echo time, 8 ms; repetition time, 50 ms; number of acquisitions, 2; slice width, 16 mm; image size, 150x160x80; field of view, 30x32x16 mm³; flip angle, 20°; total scan time of 23 min, 28 s. After the scanning

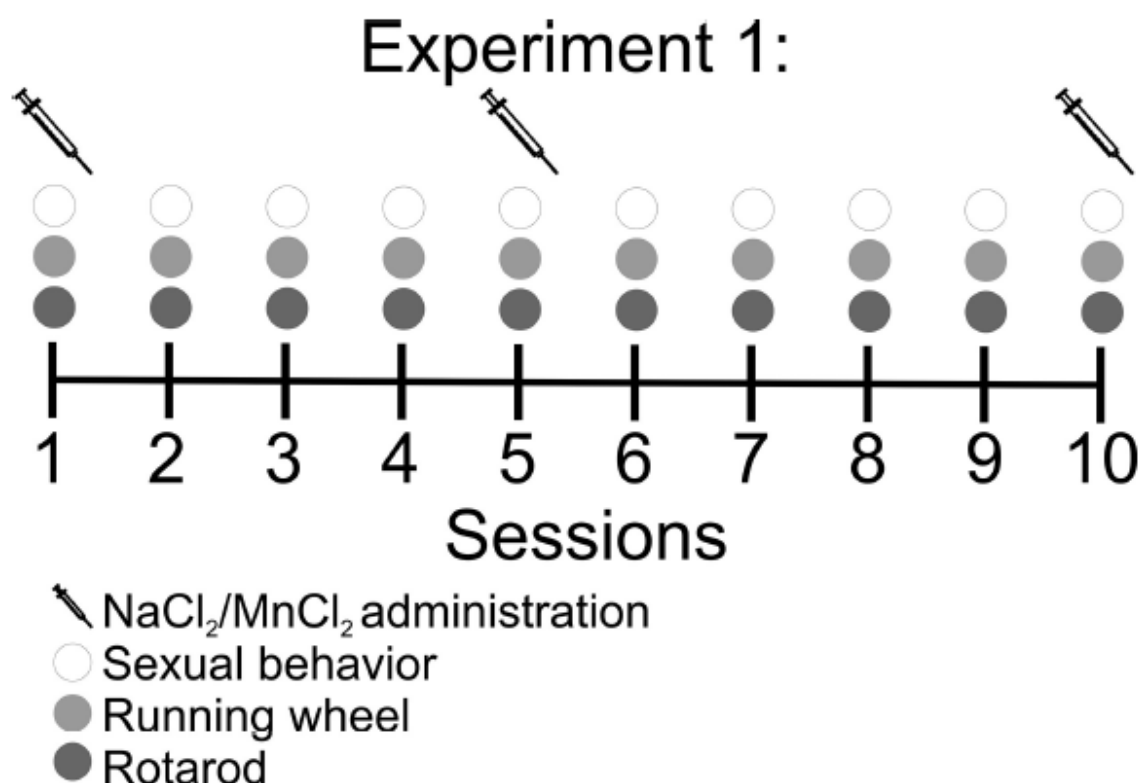


Fig 1. Timeline of the behavioral tests to evaluate the effects of manganese administration. Subjects were tested once a week for 10 consecutive weeks for sexual behavior, immediately followed by running wheel and then by the rotarod test. Twenty-four hours before sessions 1, 5 and 10 subjects were injected with saline, 8 or 16 mg/kg of MnCl₂.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272271.g001>

session, the animal was placed in an empty cage and monitored until full recovery before they were returned to their home cage.

MEMRI preprocessing. Image preprocessing was performed with FSL (FMRI Software Library v6.0) and ANTs (Advanced Normalization Tools, v2.1) software libraries. We used the function *DenoiseImage* for denoising. Then, we created an average brain (as template) using the set of scans from session 1 Multivariate Template Construction tool. Once the template was created, spatial normalization was performed on denoised images, using the ANTs Registration SyN tool, and then the scans from sessions 1, 5 and 10, were registered to the template. Then, we use the tool *fslmerge* from FMRIB Software Library v6.0 to merge all the aligned scans. The images were checked for quality control to eliminate images with artifacts or bad coregistration. Signal intensity normalization was performed extracting the data from the Harderian gland and dividing each image with its own value using *fslmaths*. Finally, the BET (Brain Extraction Tool) was used to remove all non-brain tissue from the intensity-normalized images.

Image analysis. For the image analysis, regions of interest (ROIs) were drawn using the template and the Paxinos and Watson rat atlas as guide [36]. The ROIs were from olfactory bulb (OB), bed nucleus of the stria terminalis (BNST), medial preoptic area (MPOA), ventromedial

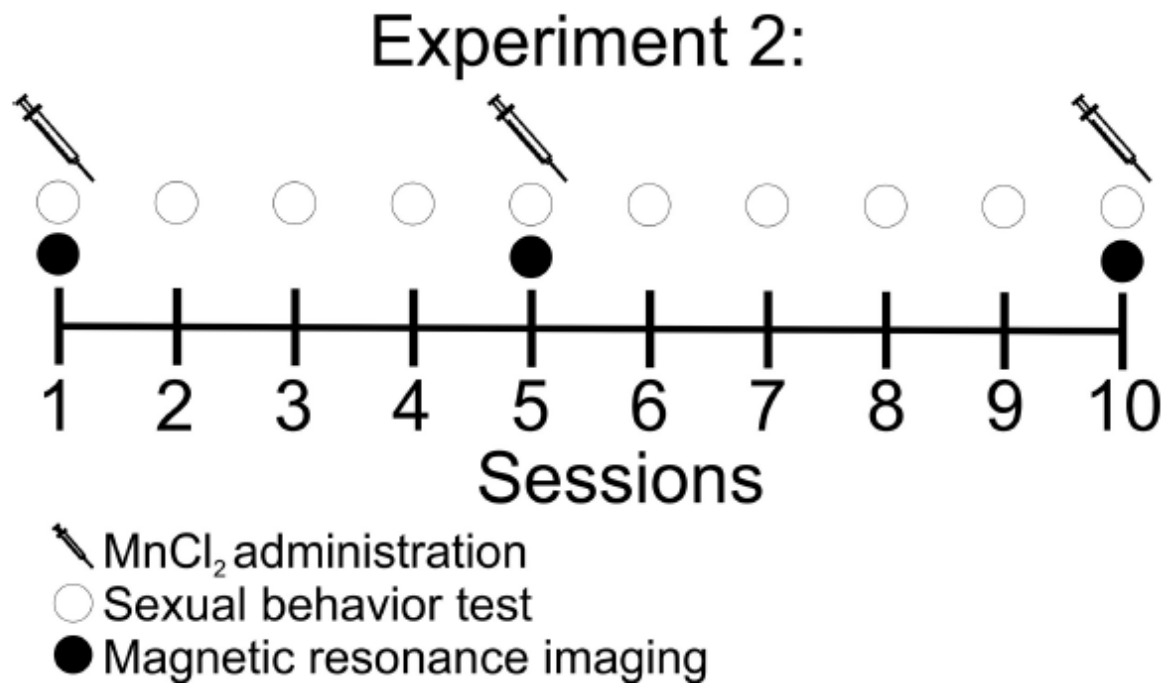


Fig 2. The timeline of experiment 2 was similar to that of experiment 1. Subjects were tested once a week for 10 consecutive weeks for sexual behavior. The control groups were left alone in the mating cage for 30 minutes. Twenty-four hours before sessions 1, 5 and 10 subjects were injected with 8 or 16 mg/kg of MnCl₂ depending on the group. They mated during the sexual interaction. The control females did not mate. Immediately after the test, MR images were obtained.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272271.g002>

hypothalamus (VMH), nucleus accumbens (NAcc), amygdala (AMG), the hippocampus (Hipp), the striatum (STR) and the ventral tegmental area (VTA). For signal normalization, a ROI was created from the Harderian gland [32]. As a control region, a mask from the pituitary gland was created. The extraction of the average intensity from the ROIs was carried out using the FSLUTILS command-line *fslmeants*.

Data analysis. The behavioral and MRI data had no homogeneity of variance or normal distribution. In experiment 1, sexual behavior, running wheel and rotarod data were analyzed with a Friedman one Way ANOVA for repeated measures to compare within groups along the 10 sessions. Comparisons between groups in each session were done by a Kruskal Wallis (KW) test followed, in case of significance effects, by a Mann-Whitney U Test (MWU) as a *post hoc* test. In experiment 2, sexual behavior data was analyzed using the Mann-Whitney U Test to compare the two groups of females that mated.

The MRI data for each ROI was also analyzed by a Friedman one Way ANOVA for repeated measures to compare within groups in sessions 1, 5 and 10 and Tukey *post hoc* test in case of significant differences. Comparisons between groups with the same dose in the same sessions were done by the MWU test. The signal intensity of the OB, the BNST, the AMG, the MPOA and the VMH was grouped to analyze the socio-sexual circuit and the signal intensity of the NAcc, the STR, the Hipp and the VTA was grouped to analyze the reward circuit. The Friedman one way ANOVA was used to compare the activity of the circuits along the sessions

and comparisons between groups in the same sessions were done by a Kruskal Wallis test followed, in case of significant effects, by the MWU test.

A Cohen's D analysis was applied to the images. Briefly, we obtained the group mean from session 1, 5 and 10; the mean of session 1 was subtracted from the mean of session 10, and then divided with the standard deviation from session 1; the same procedure was applied with session 5, subtracting the mean of session 1 and dividing the result with the standard deviation of session 1. This was also done to compare sessions 5 and 10. Then, a voxel-wise analysis was performed on the spatial and signal intensity normalized images. Using the *Glm* tool from FSL, contrasts for the group comparisons were created, and the *randomise* function was used to perform the analysis. P-value corrected images were binarized using *fslmaths* and threshold to 0.95. Finally, the binarized images were corrected with the results from the Cohen's D analysis.

Results

Experiment 1

In the first experiment we wanted to evaluate if doses of 8 or 16 mg/kg of MnCl₂ altered sexual behavior, running wheel or the rotarod test.

Sexual behavior test. No significant differences were observed between groups on sessions 1, 5 and 10. As well no significant differences were observed between sessions for any of the sexual behavior parameters evaluated (see Table 1). The statistical values for each sexual behavior variable are presented on S1 Table.

Running wheel test. When we compared the running distance per session for the different groups (Fig 3) there were significant differences in sessions 6, 8 and 9 (Kruskal Wallis test, session 6, $H = 5.985$, $df = 2$, $p = 0.05$; session 8, $H = 6.14$, $df = 2$, $p = 0.046$; session 9, $H = 10.905$, $df = 2$, $p = 0.004$). In sessions 6 (MWU = 11, $T = 89$, $p = 0.028$) and 8 (MWU = 7,

Table 1. Sexual behavior parameters in sessions 1, 5 and 10, in females treated with saline, 8 or 16 mg/kg of MnCl₂ 24 hours before testing with a sexually experienced male in experiment 1. Data are expressed as mean \pm SEM. (III: Inter intromission interval; MLI: Mean lordosis intensity; LQ: Lordosis quotient).

Groups	Control (n = 9)			8 mg/kg (n = 8)			16 mg/kg (n = 9)		
	1	5	10	1	5	10	1	5	10
Sessions									
Mounds	12.67 \pm 4.2	4.4 \pm 1.4	6.5 \pm 2	15.6 \pm 6.7	5.9 \pm 1.7	11 \pm 5.3	10.3 \pm 4.2	10.8 \pm 2.7	2.8 \pm 1
Intrusions	15.1 \pm 1.5	11.7 \pm 2.6	10.3 \pm 2.7	16.4 \pm 2.6	14.2 \pm 2.5	4.5 \pm 1.5	13.7 \pm 2.4	14.2 \pm 2.6	12.2 \pm 5.5
Ejaculations	1.3 \pm 0.4	1.4 \pm 0.5	1 \pm 0.4	1.5 \pm 0.5	1.5 \pm 0.4	0.5 \pm 0.3	0.8 \pm 0.3	1.4 \pm 0.3	1.7 \pm 0.4
Latencies									
Mounds	69.8 \pm 22.8	239.4 \pm 146	156.2 \pm 64.3	55.9 \pm 26.7	92 \pm 41.7	304 \pm 121.4	114 \pm 56.6	264 \pm 94.8	28.78 \pm 10.7
Intrusions	150.1 \pm 55.8	291.2 \pm 175	239.5 \pm 103	252.4 \pm 113	278 \pm 137.7	214.2 \pm 100	187 \pm 56.6	303 \pm 97.6	78.9 \pm 31.4
Ejaculations	390 \pm 123.5	302.1 \pm 110	505 \pm 199.6	369.7 \pm 123	530 \pm 155.3	454.7 \pm 223	426 \pm 170	1029 \pm 222	540 \pm 151.5
III	39.4 \pm 12.1	28.9 \pm 9.8	36.2 \pm 12.1	30.9 \pm 11.8	44.9 \pm 13.6	29.4 \pm 14.8	26.2 \pm 11	71.7 \pm 17	43.6 \pm 10.8
MLI	2 \pm 0	1.8 \pm 0.2	1.5 \pm 0.3	1.97 \pm 0.01	2 \pm 0	1.5 \pm 0.3	1.7 \pm 0.2	1.99 \pm 0	1.5 \pm 0.3
LQ	100 \pm 0	88.9 \pm 11.1	77.8 \pm 14.7	100 \pm 0	100 \pm 0	75 \pm 16.4	88.9 \pm 11	100 \pm 0	77.8 \pm 14.8
Return latencies after									
Mounds	9.6 \pm 4.7	7.4 \pm 3.9	4.7 \pm 2.4	9.9 \pm 3.7	9.9 \pm 3.7	7.5 \pm 3.7	11.1 \pm 4.2	11.1 \pm 4.2	5.6 \pm 2.6
Intrusions	39.6 \pm 3.9	29.2 \pm 5.4	42.2 \pm 17.3	46 \pm 12.3	46 \pm 12.3	24.3 \pm 8.3	42 \pm 7.8	42 \pm 7.8	27.9 \pm 6.2
Ejaculations	63.3 \pm 21	48 \pm 22.7	73.2 \pm 33.6	69.6 \pm 28	69.6 \pm 28	45 \pm 23.4	58.9 \pm 37.1	58.8 \pm 37	118.3 \pm 41.8
Percentage of exits after									
Mounds	18 \pm 6.5	23.1 \pm 12.9	9.9 \pm 5.8	22.6 \pm 12	34 \pm 12.8	7.6 \pm 4.6	10.4 \pm 6.5	16.3 \pm 3.9	28.7 \pm 12.8
Intrusions	71.5 \pm 7.8	71.9 \pm 10.5	70.6 \pm 13.8	71.3 \pm 7.5	81.7 \pm 4.3	51.6 \pm 15.7	45.2 \pm 10	83.6 \pm 3.3	66.6 \pm 13.6
Ejaculations	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272271.t001>

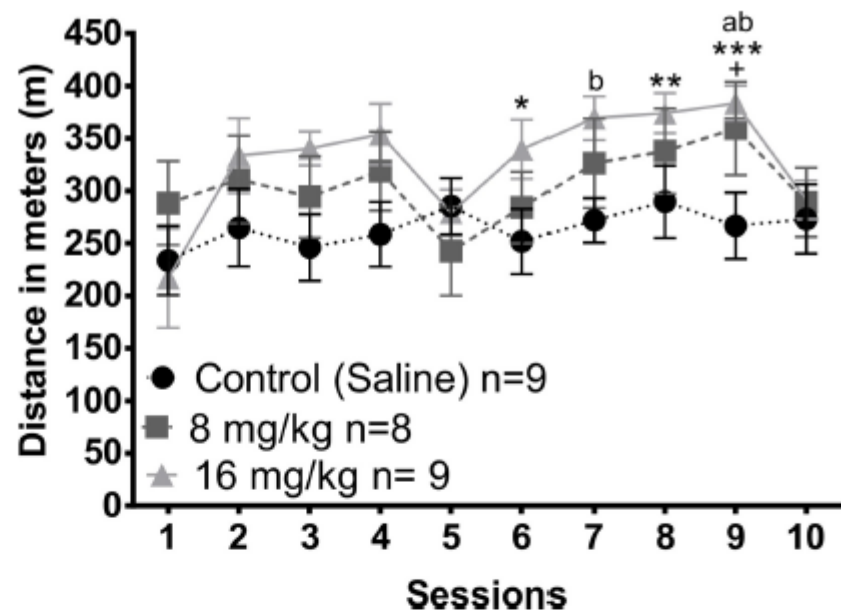


Fig 3. Distance traveled in the running wheel test in the different group of animals along the 10 weeks of testing. Twenty-four hours before sessions 1, 5 and 10 subjects were injected with saline, 8 mg/kg or 16 mg/kg of $MnCl_2$. Data presented as mean \pm SEM. + Difference between 8 mg/kg and control group, $p < 0.05$. * Difference between 16 mg/kg and control group, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. a Difference from session 5 within the 8 mg/kg, $p < 0.05$. b Difference from session 1 within the 16 mg/kg, $p < 0.05$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272271.g003>

$T = 93$, $p = 0.007$) animals treated with 16 mg/kg ran a longer distance compared to the control group. In session 9 subjects treated with 8 mg/kg (MWU = 13, $T = 49$, $p = 0.05$) and 16 mg/kg (MWU = 2, $T = 38$, $p < 0.001$) ran a longer distance compared to the control group. When we compared the running distance for each group along the different sessions using the Friedman repeated measures ANOVA, significant differences were found in the groups injected with 8 ($X^2 = 17.344$, $df = 9$, $p = 0.044$) and 16 mg/kg ($X^2 = 26.55$, $df = 9$, $p = 0.002$). Post hoc tests revealed that in the 8 mg/kg group subjects ran longer distance in sessions 9 in comparison to session 5 ($q = 4.613$). In the group treated with 16 mg/kg subjects ran a longer distance on session 7 ($q = 4.554$) and 9 ($q = 4.554$) in comparison to session 1. No differences were found in the control group along the 10 sessions ($X^2 = 9.335$, $df = 9$, $p = 0.407$). The statistical values for the different running wheel comparisons are presented on [S2A and S2B Table](#).

Rotarod test. After the running wheel test, subjects were taken to the rotarod apparatus and were evaluated in two modalities, constant velocity (10 rpm) and increased velocity (10–15 rpm) with a maximum duration of 3 min for each test.

Constant velocity. According to the Kruskal Wallis test, there were no significant differences in the fall latency in the constant velocity test (10 rpm) between groups along the 10 weeks of testing ([Fig 4](#)). As well, the Friedman repeated measures ANOVA revealed no significant differences along the sessions within each group. The statistical values are presented on [S2A and S2B Table](#).

Increased velocity. No differences were found in the fall latency in the increased velocity (10–15 rpm) test in the 10 weeks of testing ([Fig 5](#)). No differences between groups along the

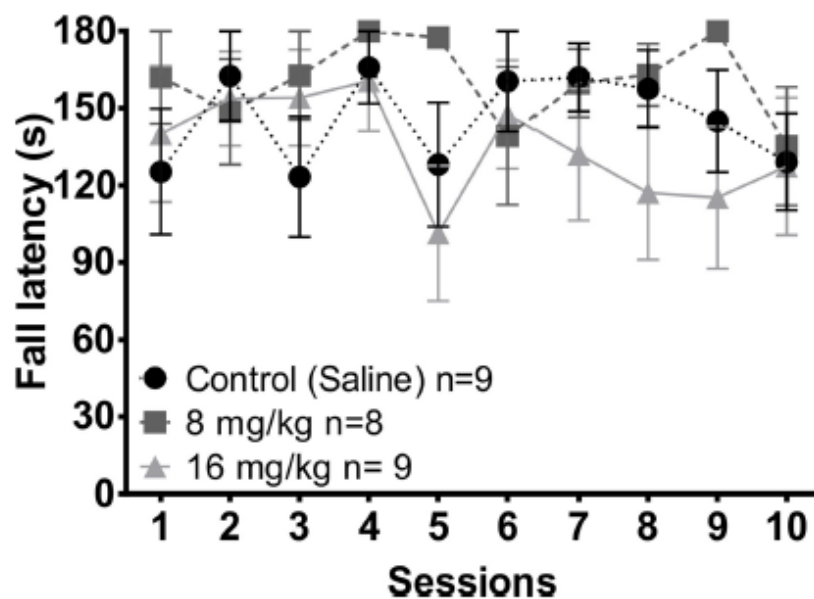


Fig 4. Fall latency in the constant velocity (10 rpm) rotarod test in the different groups of animals along the 10 weeks of testing. Twenty-four hours before sessions 1, 5 and 10 subjects were injected with saline, 8 mg/kg or 16 mg/kg of MnCl₂. Data are presented as mean ± SEM.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272271.g004>

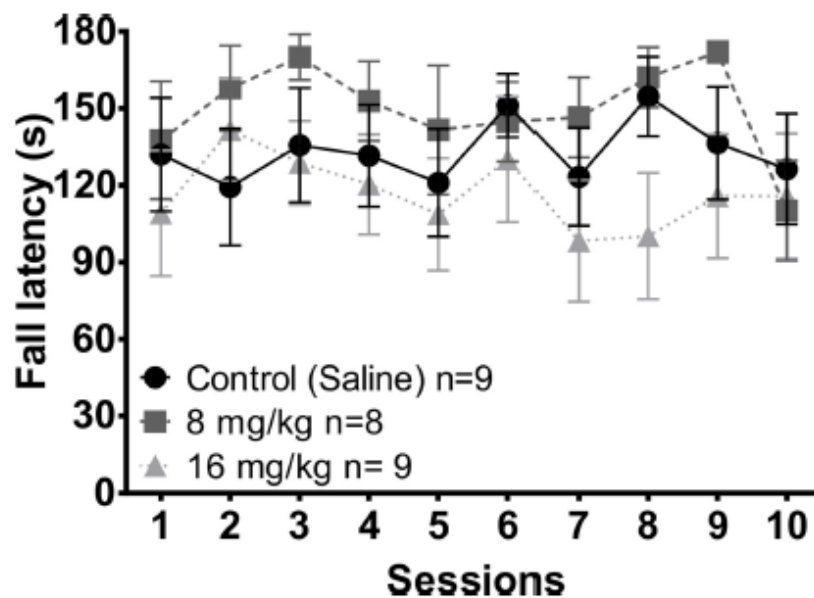


Fig 5. Fall latency in the increased velocity (10-15 rpm) rotarod test in the different groups of animals along the 10 weeks of testing. Twenty-four hours before sessions 1, 5 and 10 subjects were injected with saline, 8 mg/kg or 16 mg/kg of MnCl₂. Data are presented as mean ± SEM.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272271.g005>

sessions were found based on the Kruskal Wallis test. The statistical values are presented on the [S2A and S2B Table](#).

Together, the results of experiment 1 indicate that the doses of 8 and 16 mg/kg of MnCl₂ do not induce behavioral alterations that could interfere with the interpretation of the MRI results.

Experiment 2

As already described, to evaluate the signal intensity induced by MnCl₂ four additional groups were used: females that did not mated injected with 8 or 16 mg/kg of MnCl₂ and females that mated pacing the sexual interaction injected with 8 or 16 mg/kg of MnCl₂. Females were tested once a week for 10 weeks and taken to the MRI facility and scanned on weeks 1, 5 and 10.

Sexual behavior test. Results of session 1, 5 and 10 are presented in [Table 2](#). There was a significant difference in the mount latency in session 10 between groups (MWU = 38, T = 129, p = 0.018), with the 16 mg/kg group having a larger mount latency. As can be seen, the number of ejaculations received by the females was higher (Friedman test, X² = 8.977, df = 2, p = 0.011) in sessions 5 in comparison to session 1 (q = 3.467) in the 8 mg/kg group. Mount latency was reduced in session 10 in comparison to session 1 in the group treated with 8 mg/kg (FT, X² = 6.157, df = 2, p = 0.046; Tukey post hoc, q = 3.467). There was a significant increase in the percentage of exits after intromissions in both groups in sessions 5 and 10 with respect to their own session 1 (8 mg/kg group, X² = 12.118, df = 2, p = 0.002), session 5 vs session 1 (Tukey Test, q = 3.744), session 10 vs session 1 (Tukey Test, q = 4.576); the 16 mg/kg group (X² = 7.385, df = 2, p = 0.025), session 5 vs session 1 (TT, q = 3.328) and session 10 vs session 1 (TT, q = 3.328). The statistical values are presented on the [S3 Table](#).

Table 2. Sexual behavior parameters in sessions 1, 5 and 10, in females treated with 8 and 16 mg/kg of MnCl₂ 24 hours before testing and scanned. Data are expressed as mean ± SEM. (III: Inter intromission interval; MLI: Mean lordosis intensity; LQ: Lordosis quotient).

Groups	8 mg/kg (n = 13)			16 mg/kg (n = 13)		
	1	5	10	1	5	10
Sessions						
Mounts	13.3 ± 3.57	12.4 ± 2.72	4.46 ± 1.46	10.85 ± 2.71	10.35 ± 2.41	6.00 ± 1.71
Intromissions	12 ± 1.61	15.84 ± 2.1	15.69 ± 1.96	10.28 ± 1.95	14.92 ± 2.09	13.00 ± 2.19
Ejaculations	0.76 ± 0.25	1.76 ± 0.2*	1.69 ± 0.26	0.57 ± 0.20	1.42 ± 0.27	1.57 ± 0.30
Latencies (sec)						
Mount	79.7 ± 25.6	59 ± 25.73	13.4 ± 4.0*	114.5 ± 27.3	288 ± 122.9	173.6 ± 89.3*
Intromission	129.23 ± 37	98.84 ± 56	26.69 ± 11	172.6 ± 46.5	249.9 ± 78.25	204.92 ± 88.4
Ejaculation	376.7 ± 125	630 ± 134.8	546 ± 128.7	411.78 ± 149	708.8 ± 158.3	587.8 ± 138.4
III (sec)	44.8 ± 18	57.1 ± 9.95	53.6 ± 13.18	40.9 ± 15.63	48.89 ± 9.41	53.32 ± 13.31
MLI	1.84 ± 0.15	1.82 ± 0.15	1.83 ± 0.15	1.71 ± 0.19	2.00 ± 0.0	1.85 ± 0.14
LQ	92.3 ± 7.69	92.3 ± 7.69	92.30 ± 7.69	85.71 ± 9.70	100.00 ± 0.0	92.85 ± 7.14
Return latency (sec)						
Mount	23.8 ± 8.87	3.76 ± 2.05	3.59 ± 1.96	14.67 ± 6.54	4.88 ± 2.06	2.42 ± 1.27
Intromission	68.53 ± 21	34.86 ± 9.6	38.85 ± 15.5	41.5 ± 15.36	34.70 ± 5.91	44.02 ± 17.6
Ejaculation	23 ± 11.46	128 ± 42.36	102.8 ± 25.7	31.8 ± 19.57	94.7 ± 21.6	148.1 ± 66.2
Percentage of exits after						
Mount	9.89 ± 5.02	8.54 ± 5.77	15.71 ± 6.74	9.77 ± 4.36	12.55 ± 5.33	11.22 ± 5.60
Intromission	33.91 ± 7.1	69.14 ± 7*	76.5 ± 7.15*	28.05 ± 8.34	70.4 ± 8.75*	74.69 ± 7.14*
Ejaculation	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0

* Different from the 8 mg/kg in the same session, p < 0.05

a Different from session 1 in their corresponding group, p < 0.05

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272271.t002>

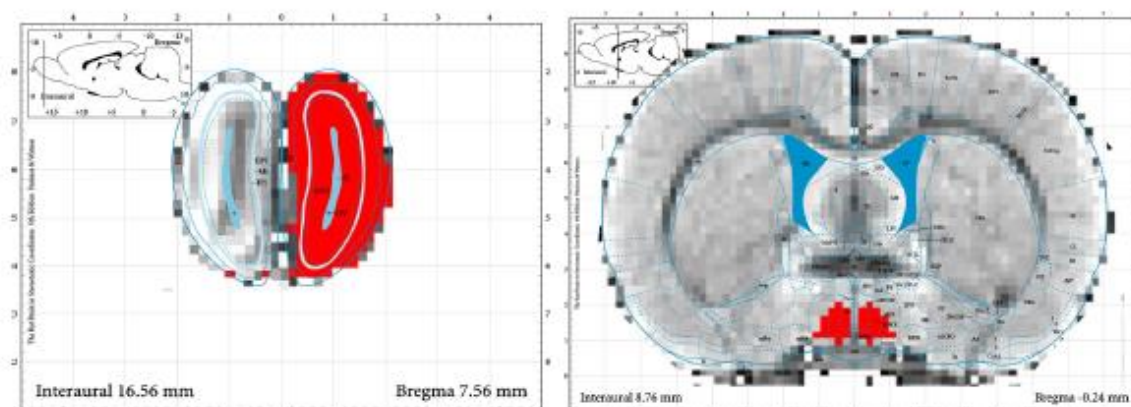


Fig 6. Examples of ROIs using the atlas of Paxinos as reference [36]. From left to right, the olfactory bulb and the medial preoptic area.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272271.g006>

MEMRI. The images obtained were analyzed using regions of interest (ROI) from brain areas that control sexual behavior, examples of the ROIs used are presented in Fig 6. The four groups were compared on sessions 1, 5 and 10. With the 8 mg/kg dose we found significant differences between the group that mated and the control group, injected with $MnCl_2$. However, we found no differences with respect to session 1 (see S1 and S2 Figs). On the other hand, the 16 mg/kg dose clearly showed significant differences with respect to the control group and against session 1 indicating that this dose allows us to observe changes in signal intensity with behavioral experience. The statistical values for each comparison for each ROI are presented on S4A, S4B, and S5A Tables.

Olfactory bulb. A higher signal intensity (Fig 7) was observed in session 10 in the SB 16 mg/kg group (MWU = 27, $T = 118$, $p = 0.003$), in comparison to the control group. A significant difference was observed along the sessions in the SB 16 mg/kg group ($X^2 = 10.308$, $df = 2$, $p = 0.006$). Tukey *post hoc* analysis revealed a higher signal intensity in session 10 in comparison to session 1 ($q = 4.438$).

Bed nucleus of the stria terminalis. Results showed an increased signal intensity (Fig 7) in session 10 in comparison to session 1 (FT, $X^2 = 10.308$, $df = 2$, $p = 0.006$, Tukey *post hoc*, $q = 4.438$) in the SB 16 mg/kg group.

Amygdala. Significant differences were found (Fig 7) in session 10, with higher signal intensity observed in the SB 16 mg/kg group against its control (MWU = 40, $T = 131$, $p = 0.024$). The SB 16 mg/kg group showed an increased signal intensity in session 10 ($X^2 = 12.423$, $df = 2$, $p = 0.002$) in comparison to session 5 (Tukey *post hoc*, $q = 3.328$) and session 1 (Tukey *post hoc*, $q = 4.992$).

Medial preoptic area. In the MPOA (Fig 7) higher signal intensity was observed in the SB 16 mg/kg group in comparison to the control group in session 10 (MWU = 50, $T = 131$, $p = 0.024$). This group also showed a higher signal intensity in session 10 in comparison to session 1 ($X^2 = 11.231$, $df = 2$, $p = 0.004$, Tukey *post hoc*, $q = 4.715$).

Ventromedial hypothalamus. Again, we found a significant higher signal intensity (Fig 7) in session 10 for the SB 16 mg/kg group compared to the control (MWU = 31.5, $T = 122.5$, $p = 0.007$). The SB 16 mg/kg group showed an increased signal intensity (FT, $X^2 = 14$, $df = 2$, $p = <0.001$) in session 10 (Tukey *post hoc*, $q = 5.27$) in comparison to session 1.

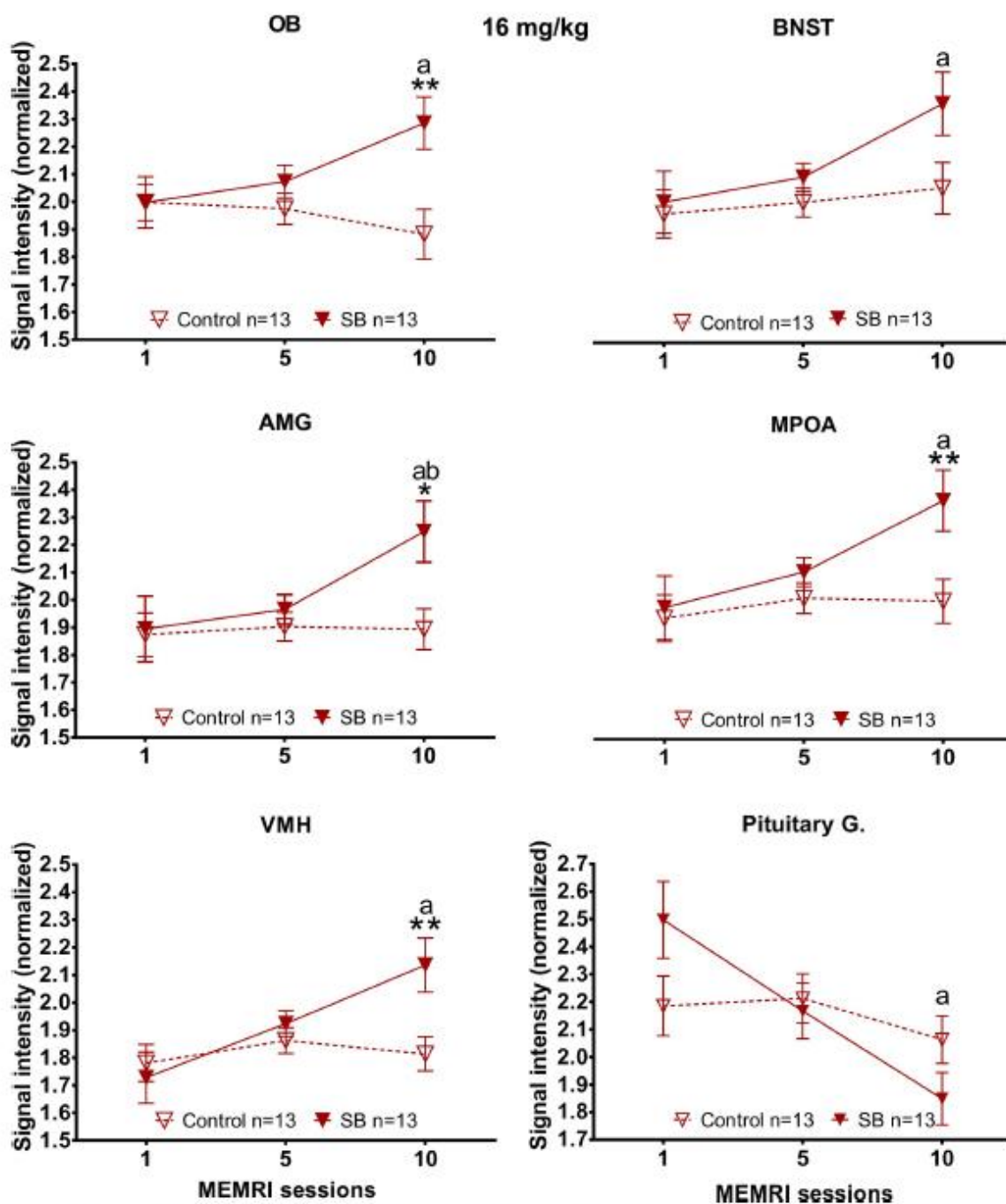


Fig 7. Signal intensity of the olfactory bulb (OB), the bed nucleus of the stria terminalis (BNST), the amygdala (AMG), the medial preoptic area (MPOA), the ventromedial hypothalamus (VMH) and the pituitary gland in subjects treated with 16 mg/kg of $MnCl_2$. Data are expressed as mean \pm SEM. * Different from control $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. a Different from session 1 $p < 0.05$. b Different from session 5 $p < 0.05$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272271.g007>

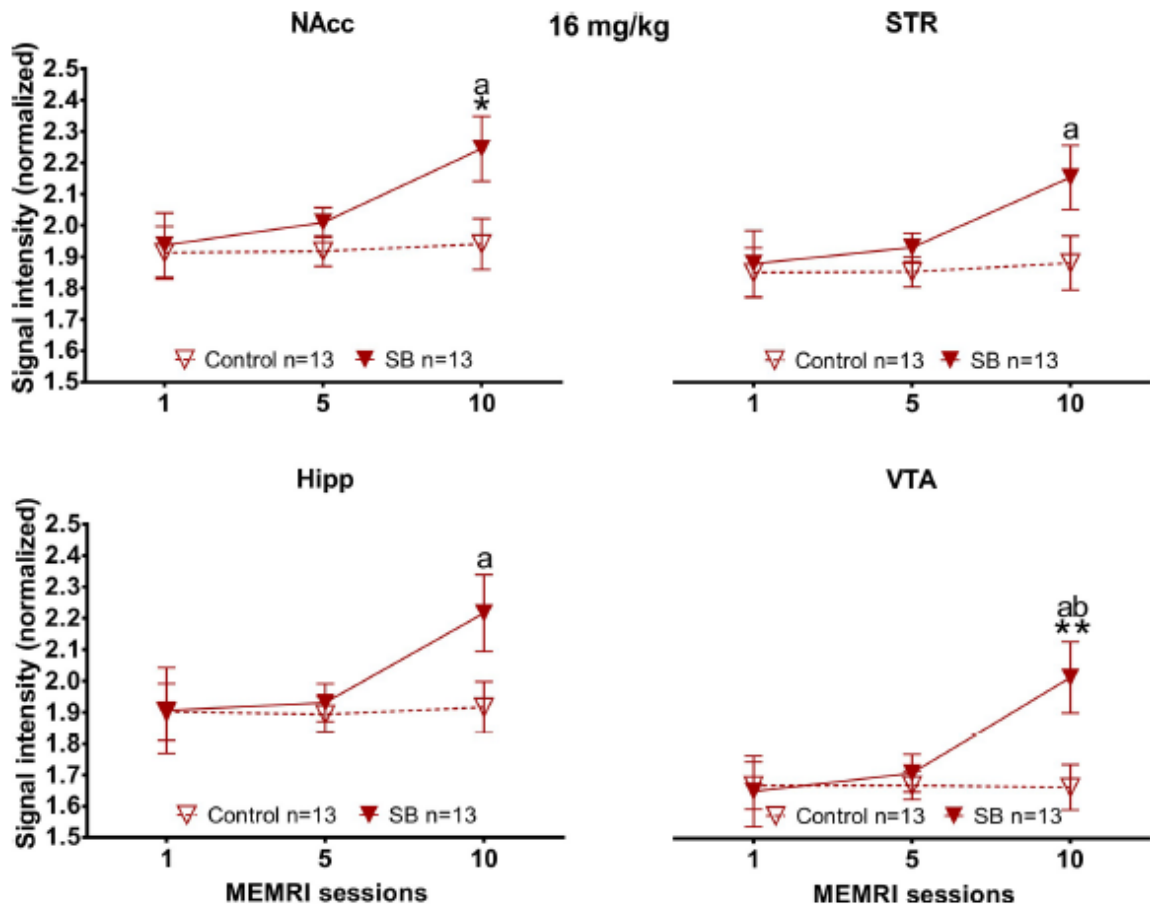


Fig 8. Signal intensity in the nucleus accumbens (NAcc), the striatum (STR), the hippocampus (Hipp) and the ventral tegmental area (VTA) after the females paced the sexual interaction in subjects treated with 16 mg/kg of $MnCl_2$. Data are expressed as mean \pm SEM. * Different from control, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. a Different from session 1, $p < 0.05$. b Different from session 5, $p < 0.05$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272271.g008>

Pituitary gland. Signal intensity from the pituitary gland decreased in the SB 16 mg/kg group in session 10 (FT, $X^2 = 14$, $df = 2$, $p = < 0.001$) compared to session 1 (Tukey *post hoc*, $q = 5.27$).

Nucleus accumbens. A significant increase in signal intensity (Fig 8) was observed in session 10 in the SB 16 mg/kg compared to its control (MWU = 44, $T = 135$, $p = 0.04$). The SB 16 mg/kg group also showed a higher signal intensity in session 10 ($X^2 = 9.846$, $df = 2$, $p = 0.007$) in comparison to session 1 (Tukey *post hoc*, $q = 4.438$).

Striatum. Significant differences were found in the SB 16 mg/kg group in session 10 against its session 1 (FT, $X^2 = 8$, $df = 2$, $p = 0.018$; TT, $q = 3.883$).

The hippocampus. Similar results were found in the hippocampus, with a higher signal intensity observed in session 10 ($X^2 = 9.294$, $df = 2$, $p = 0.01$) in comparison to its own session 1 (Tukey *post hoc*, $q = 4.16$) in the SB 16 mg/kg group.

Ventral tegmental area. Significant differences were observed (Fig 8) in session 10 between SB 16 mg/kg group versus its control (MWU = 33, T = 124, $p = 0.009$). Significant differences were found in the SB 16 mg/kg group along sessions ($X^2 = 9.692$, $df = 2$, $p = 0.008$), in session 10 a higher signal intensity was found in comparison to session 5 (Tukey *post hoc*, $q = 3.328$) and session 1 (Tukey *post hoc*, $q = 4.16$).

Brain circuits. We also analyzed the data comparing the average of the signal intensity of the areas associated with socio-sexual behaviors which included the OB, BNST, AMG, MPOA, and the VMH; and those associated with the reward circuit, NAcc, STR, Hipp, and VTA [38]. We analyzed the activation of both circuits in weeks 1, 5 and 10 with the dose of 16 mg/kg. The statistical values for the comparison for the brain circuits are presented on S5B and S5C Table.

As we can see in Fig 9, all groups had the same signal intensity in session 1 (KWT, $H = 5.678$, $df = 3$, $p = 0.128$). In session 5 the signal intensity was significantly increased (KWT, $H = 28.326$, $df = 3$, $p < 0.001$) in the socio-sexual circuit in the SB group compared to its control (MWU = 1559, T = 4811, $p = 0.010$), but not on the reward circuit (MWU = 1112.5, T = 2969, $p = 0.12$). In session 10 both circuits in the SB group had a significant increase in

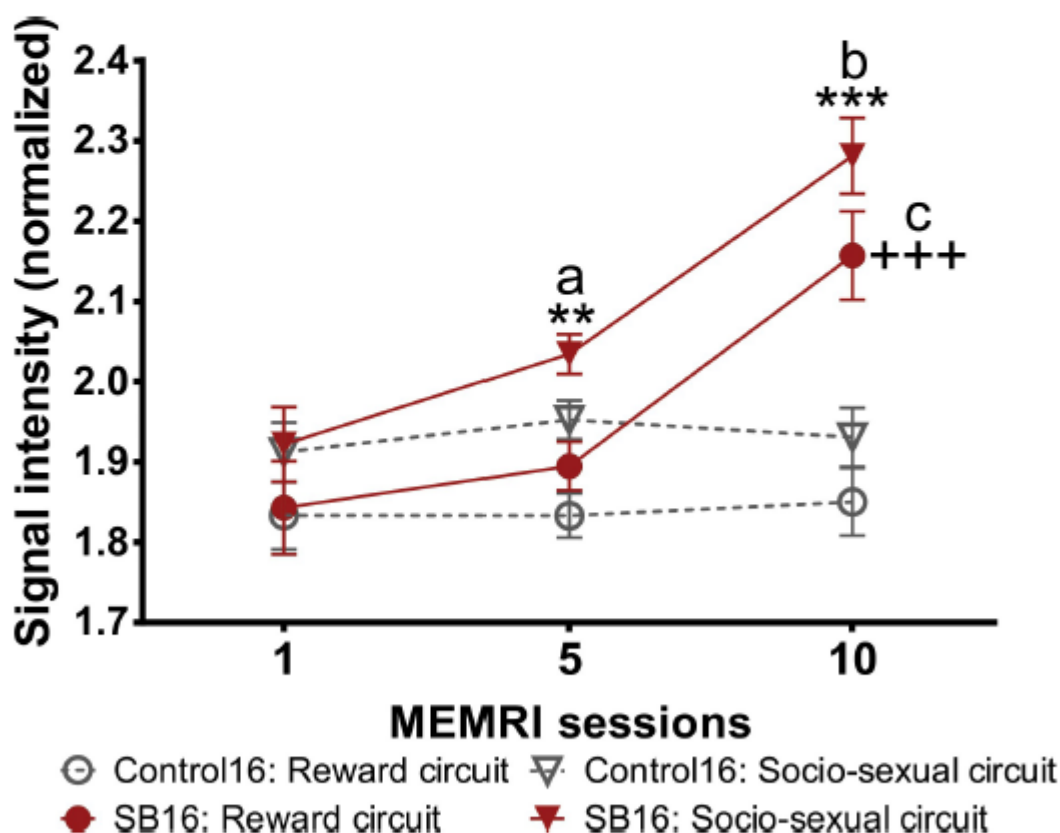


Fig 9. Signal intensity in the socio sexual behavior and reward circuits in the control and in the group that paced the sexual interaction after treatment with 16 mg/kg of MnCl₂. Data are expressed as mean \pm SEM. ** Socio-sexual circuit, different from control and reward circuit in the same session $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. +++ Reward circuit different from its control, $p < 0.001$. a Socio-sexual circuit, different from session 1, $p < 0.001$. b Socio-sexual circuit, different from session 1 and 5, $p < 0.01$. c Reward circuit, different from session 1 and 5, $p < 0.001$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272271.g009>

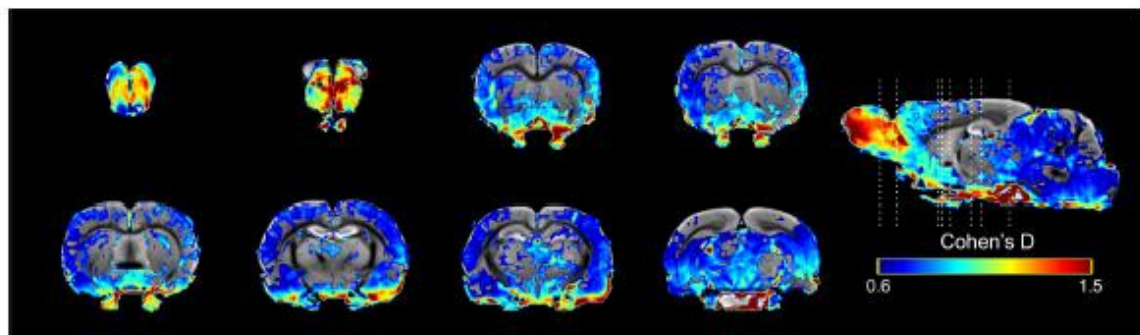


Fig 10. Results from the Cohen's D analysis from the comparisons of control and sexual behavior from 16 mg/kg in session 10.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272271.g010>

signal intensity (KWT, $H = 49.429$, $df = 3$, $p < 0.001$) compared to their own control (Socio-sexual circuit, $MWU = 946.5$, $T = 5423.5$, $p < 0.001$; Reward circuit, $MWU = 758.5$, $T = 3324$, $p < 0.001$). Comparisons across time showed a significant increase of signal intensity in the Socio-sexual circuit in the SB group ($X^2 = 57.723$, $df = 2$, $p < 0.001$) in session 5 vs session 1 (TT, $q = 4.217$); and session 10 vs session 1 (TT, $q = 10.667$) and session 5 (TT, $q = 6.45$). Similar results were found in the Reward circuit in the SB group ($X^2 = 36.203$, $df = 2$, $p < 0.001$) in session 10 vs session 1 (TT, $q = 8.321$) and session 10 vs session 5 (TT, $q = 5.616$).

Cohen's D analysis. The Cohen's D analysis shows the changes in size effects between sessions and groups [39]. In our analysis, we compared the control group vs the sexual behavior group treated with 16 mg/kg in session 1, 5 and 10. No differences were found in session 1 and 5. In session 10, medium size changes ($d = 0.6-0.8$) were observed in different brain areas, but the larger changes in effect size ($d > 1$) were found in the OB, the BNST, the MPOA, the VMH and the AMG (Fig 10). The NAcc, the STR and the VTA also showed large changes in effect size ($d = 0.9$). On the hippocampus, the main changes in size effect were observed in the dentate gyrus ($d > 1.2$) more so than in the CA3 ($d = 0.6$) (Fig 10).

When we compared the signal intensity between sessions in the sexual behavior group (Fig 11), we found large effects in session 10 against session 1 in the OB, the BNST, the MPOA, the VMH and the AMG ($d > 1$). In contrast, the effect size in the NAcc, the STR and the VTA were medium ($d < 0.8$).

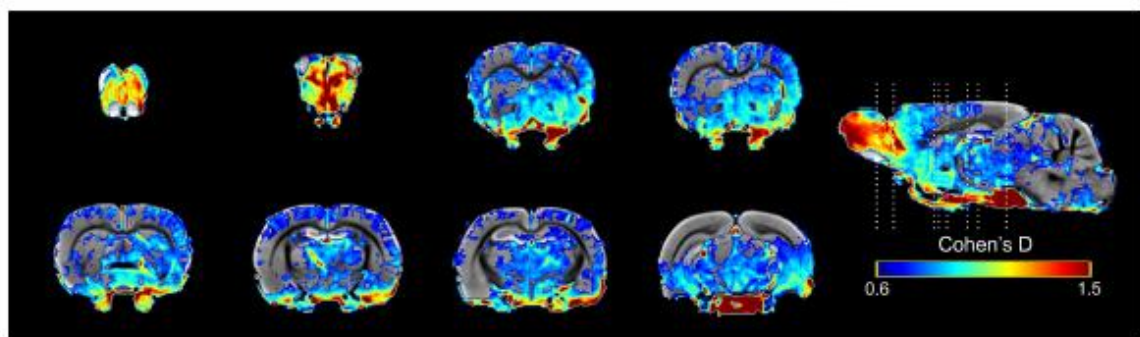


Fig 11. Results of the Cohen's D analysis from the comparisons of sexual behavior group with 16 mg/kg in session 10 against its session 1.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272271.g011>

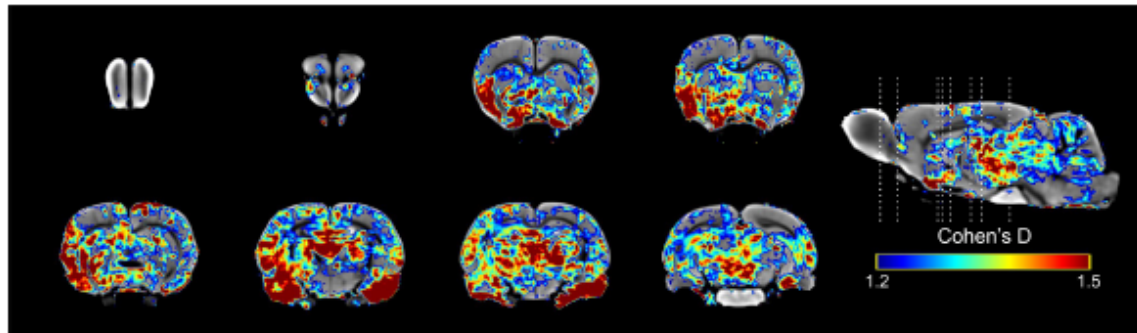


Fig 12. Results of the Cohen's D analysis from the comparisons of sexual behavior group with 16 mg/kg in session 10 against its session 5.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272271.g012>

When comparing session 10 with session 5 (Fig 12) no further increase in effect size was observed in most of the areas studied.

Discussion

The results of sexual behavior tests in experiment 1 and 2 clearly demonstrate that the administration of 8 or 16 mg/kg of $MnCl_2$ 24 hours before testing do not interfere with the display of sexual behavior of the female rat. All groups display similar levels of sexual receptivity as assessed by the lordosis quotient and the mean lordosis intensity. As well, we can infer that they were equally proceptive since no differences were found between the $MnCl_2$ treated groups and the control in the percentage of exits and the mean return latencies after receiving a mount, an intromission, or an ejaculation from the stimulus males. These measures of the paced mating condition are a better representation of sexual motivation than hops, darts and ear wiggling because the latter ones may or no may occur when females paced the sexual interaction [1] in some cases they are reduced when females paced in comparison when they don't pace the sexual interaction [40]. It is also clear that the administration of $MnCl_2$ didn't modify any of the sexual parameters displayed by the females across the 10 weeks of testing. The MLI and LQ remained high, the percentage of exits and the return latencies are similar to what we [41–43] and others [1, 2] have consistently described.

The results of the RW test demonstrate that the administration of 8 or 16 mg/kg of $MnCl_2$ 24 hours before testing do not induce a reduction of RW on weeks 1, 5 and 10 demonstrating that these doses do not affect this motivated behavior. The distance traveled in sessions 6, 8 and 9 increased in comparison to the control group in animals treated with 16 mg/kg. These results could indicate that long term administration of $MnCl_2$ can increase locomotor activity. For example, it was shown that oral exposure to manganese in pre-weaning male rats (1–21 postnatal day) increased locomotor activity when tested at 24 days old [44]. However, in session 10 all groups ran the same distance making unlikely a long-term effect of $MnCl_2$ on voluntary activity. In a previous study it was shown that doses higher than 16 mg/kg produce a dose-dependent decrease in running wheel in male rats [35]. The administration of $MnCl_2$ was done 7 days apart and 3 hours before the running activity whereas in our study it was administered on weeks 1, 5 and 10, which is at least a 4-week interval between the injections and the running activity evaluated 24 hours after the injection.

No effects of $MnCl_2$ were observed in the forced rotarod test, neither in the constant velocity or the increased velocity test. The rotarod test evaluates fine motor coordination in rats and mice [45, 46]. Previous studies showed that the rotarod performance in adult male rats is

affected by administration, between postnatal days 8–12, of 20 mg/kg of $MnCl_2$ but not by 5 and 10 mg/kg [47]. In the studies described above where $MnCl_2$ had toxic effects the compound was administered in consecutive days while in our study there was at least a 4-week interval between the injections and the tests. Taken together, the behavioral effects of $MnCl_2$ on sexual behavior, running wheel and the rotarod indicate that the doses tested do not interfere with two motivated behaviors and does not induce nonspecific behavioral effects.

In our second study we evaluated the activation of different brain regions associated with sexual behavior along 10 weeks of testing. We tested the subjects with MEMRI on sessions 1, 5 and 10 to reduce the possibility of $MnCl_2$ overlapping. The control groups were injected with 8 or 16 mg of $MnCl_2$ but did not mate showing similar signal intensity in the three sessions indicating that manganese did not accumulate in our testing paradigm to induce an increase in the signal intensity. These observations indicate that the increase in signal intensity in the experimental groups is not caused by accumulation of manganese and overlapping of its administration but is due to the display of sexual behavior.

Our images analysis demonstrates that FLASH sequence is sensitive to a sc administration of 16 mg/kg of $MnCl_2$ allowing the detection of changes in brain activity across time within the same subject and in comparison, to a control group, potentiating the advantages of using MEMRI. The FLASH sequence is relatively short (25–45 minutes) with good contrast and resolution, making possible the identification of brain structures of rodents without losing anatomical accuracy. The use of the FLASH sequence is common in magnetic resonance protocols using manganese as contrast medium [48–51]. Uselman and colleagues detected the brain activity of free moving mice after a single fear exposure [49], and they compared the brain activity before and after the exposure to a predator odor, using 25 mM/ $MnCl_2$. They identified increased neural activity in areas related to anxiety in the serotonin transporter knockout (SERT-KO) mice compared to WT. The data obtained using MEMRI was corroborated with c-Fos immunohistochemistry.

Our results agree with previous observations demonstrating that $MnCl_2$ can be used in rats to identify activation of different brain circuits without producing severe toxic effects affecting the behavior studied. A significant increase in brain activity was observed in several brain regions demonstrating that MEMRI can be used to map brain activity in an operant behavior in freely moving rats [30]. Similar results were observed in a delay matching to place water maze task. Although the subjects showed ataxia and erythema, that disappear 30 minutes after the administration of $MnCl_2$, they did not show alterations on memory performance or sensorimotor effects. The authors were able to study the enhancement of hippocampal signal without alterations of hippocampus dependent behavior using MEMRI [52]. MEMRI has also been used to identify central nervous activity in Locusts (grasshoppers). The experimental group was forced to walk on a treadmill for two hours while the control group was immobilized. A significantly higher signal was observed in the walking subjects in ganglions controlling walking behavior [27]. MEMRI has also shown its reliability for auditory brain mapping after a single injection in mice. Subjects with a unilateral conductive hearing loss at different ages were studied with MEMRI demonstrating the tonotopic organization of the mouse inferior colliculus [53]. These results demonstrate that MEMRI can be used, as a less invasive technique, to evaluate brain activity in longitudinal studies.

Neuronal activation after sexual behavior is well documented [10, 54–57]. Long-Evan female rats that received 14 mounts with intromissions including ejaculation expressed a higher number of FOS positive cells in the preoptic and amygdala brain regions compared to females that received 15 mounts without intromission, demonstrating that neuronal activation in these areas is related to more intense vaginocervical stimulation and not just cutaneous perineal stimulation [10]. Rowe and Erskine found that not only the preoptic and amygdala are

activated by intromissions, but also the BNST showed a higher FOS response compared to females that received only mounts [54]. The only mounts group had a significant increase of FOS positive cells in the ventromedial nucleus, paraventricular nucleus (PVN) and CTF compared with home cage females. The activation of these structures was related with the display of the lordosis reflex. Flanagan-Cato and McEwen found similar results using Fos along with Jun B and C expression in the preoptic area, the BNST, the PVN and the amygdala posterodorsal comparing females that mated with females that did not mate [55]. The increase in FOS expression appears to be related with the amount of stimulation that the females received. It has been observed that the intensity of the sexual stimulation received is associated with the increase in FOS expression. Females that received an ejaculation showed a higher FOS response than when they receive an intromission. As well, those that received intromissions showed a higher FOS response than those receiving mounts. This differential expression of FOS was observed in brain regions including the MePD, the MPOA, the BNST and the VHM [56]. The importance of these brain regions in the control of sexual behavior of females and males of several species, has been demonstrated by different techniques including among others, lesion, stimulation, anatomical, histological and, as already described, by expression of immediate early genes [58].

The use of early gene expression, like c-Fos, as an indirect marker of neuronal activity allows analyzing changes in brain activity after one mating session counting individual cells in the areas of interest. On the other hand, MEMRI requires the accumulation of manganese in enough neurons to change the local magnetic field. As expected, in session 1 no statistically significant differences were observed between groups. In the groups treated with 8 mg/kg a significant increase was observed in the subjects that mated in comparison to those that did not on session 5 in all areas studied except for the VTA. On session 10 similar results were observed, higher signal intensity was detected in the subjects that mated in all areas studied except for the AMG and Hipp. In the group treated with 16 mg/kg the subjects that mated showed a higher increase with respect to the subjects that did not mate in most areas studied except for the BNST, the STR and the Hipp. The activation of these brain regions is consistent with what has been shown with other techniques.

We also analyzed two important circuits that control behaviors in different species [38]. The socio-sexual network, which regulates parental care, aggression and other social behaviors including sexual behavior. The mesolimbic reward system reinforces responses to incentive stimuli, for example sex with a conspecific. The analysis of the brain circuit controlling socio-sexual behaviors as well as the reward circuit is another advantage of MRI. Both circuits are activated but the reward circuit showed a reduced activation in session 10 in comparison to the socio-sexual circuit. Different lines of evidence have shown that sexual behavior induces a reward state in both male and female rats which is mediated by opioids [3]. From our study it is clear that both circuits are activated by sexual behavior, but the sexual circuit is activated sooner and with a higher intensity than the reward circuit. Only future studies could determine if the socio-sexual circuit maintains higher signal intensity than the reward circuit with more sexual experience.

Contrary to our expectations the 16 mg/kg dose of MnCl₂ did not induce higher signal intensity compared to the 8 mg/kg dose on session 5. The differences became evident on session 10. The reason why the signal intensity in both 8 mg/kg groups decreased is unknown. Most studies use different manganese doses and administration routes. Brunnquell and colleagues reported the effect of three doses: 30, 45 and 60 mg/kg, with 3 animals per dose [59]. *R₁* relaxation maps shows that doubling the dose does not increase significantly the median *R₁*. The controls groups treated with 8 or 16 mg/kg that did not mate showed similar signal intensity in session 1, 5 and 10 indicating that the differences observed in the SB groups are due to

the display of the behavior and not to the overlapping of manganese administrated doses. When the data of the ROIs were analyzed, a few differences were found when comparing session 5 with session 1. The sexual behavior test in the present experiment lasted 30 minutes, future experiments need to analyze if longer sessions, 60 minutes for example, can increase brain activity due to increase behavior resulting in more manganese accumulation and signal intensity. It was until session 10 that differences were evident, future studies need to determine if the increase in signal intensity can be observed between session 5 and 9.

To the best of our knowledge this is the first study using MRI, to evaluate longitudinal changes in brain activity in animals that repeatedly mated to determine the possible role of sexual experience upon the activity of brain circuits controlling sexual behavior. There are indeed few studies that have combined MRI and sexual behavior. One of those studies evaluated BOLD signal response to cocaine in females displaying or not sexual receptivity, as an indirect measure of hormone levels. Female rats that failed to display lordosis showed a greater activation of mesolimbic and nigrostriatal structures than females displaying lordosis in response to manual stimulation of the flanks. The receptive females also showed a lower response to cocaine than non-receptive females [60]. There are two studies in males in which MRI was used to assess whether neurotoxic lesions could be monitored by MRI and if the possible changes could be correlated with the behavioral alterations. In one study 6-hydroxydopamine (6-OHDA) was administered in the MPOA to reduce catecholamine (CA) neurons and fibers. The authors found a destruction of CA fibers in the MPOA by hyperintense MRI but the temporary alterations in sexual behavior were not related to changes in MRI [61]. In another study the same group evaluated the effect of NMDA lesions of the MPOA in sleep, temperature, and sexual behavior. They found that starting 3 hours after NMDA injection the brightness of the MPOA increased in the following 2 days. Again, the reduction of sexual behavior did not correlate with changes in MRI [62].

The Cohen's D analysis on the MEMRI results shows that areas associated with sexual behavior, the OB, the BNST, the MPOA, the VMH and the AMG had a larger size effect. On the other hand, a medium size effect was observed in the NAcc, the STR, the Hipp and the VTA, suggesting that in order to induce a reward state, the socio-sexual circuit needs to be activated first by the increase of sexual experience.

Conclusions

The administration of 8 or 16 mg/kg of $MnCl_2$ one month apart does not produce alterations in two motivated behaviors, sexual behavior and running wheel, and does not affect the rotarod test indicating that with this administration interval and doses we can evaluate changes in signal activity associated with a particular behavior without inducing unspecific effects. In experiment two we demonstrated that the sexual circuit is activated first and with higher intensity than the reward circuit. Our study demonstrates that MEMRI methodology using a 16 mg/kg dose of chloride manganese is optimal to use in longitudinal studies when multiple scans are required to evaluate changes in brain regions and circuits activated by motivated behaviors and how they might change with behavioral experience. The MEMRI methodology can be used in different species to evaluate in the same animal brain changes associated with a particular behavior, but possible toxic effects should be considered. It is also clear, that we can now evaluate many different aspects of sexual behavior and other motivated behaviors in both males and females, by MEMRI.

Supporting information

S1 Fig. Signal intensity of the olfactory bulb (OB), the bed nucleus of the stria terminalis (BNST), the amygdala (AMG), the medial preoptic area (MPOA), the ventromedial

hypothalamus (VMH) and the pituitary gland in subjects treated with 8 mg/kg of MnCl₂. Data are expressed as mean ± SEM. * Different from control p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001. (TIF)

S2 Fig. Signal intensity in the nucleus accumbens (NAcc), the striatum (STR), the hippocampus (Hipp) and the ventral tegmental area (VTA) after the females paced the sexual interaction in subjects treated with 8 mg/kg of MnCl₂. Data are expressed as mean ± SEM. * Different from control, p<0.05; **, p<0.01. (TIF)

S3 Fig. Signal intensity in the socio sexual behavior and reward circuits in the control and in the group that paced the sexual interaction after treatment with 8 mg/kg of MnCl₂. Data are expressed as mean ± SEM. * Socio-sexual circuit, different from control in the same session p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001. ++ Reward circuit different from control in the same session, p<0.01; +++ p<0.001. (TIF)

S1 Table. Statistical results using the Kruskal Wallis and the Friedman repeated measures test on the sexual behavior parameters comparing the different groups in experiment 1. (DOCX)

S2 Table. a) Statistical results of the Kruskal Wallis test for the running wheel and rotarod (in both modalities) comparing the different groups in experiment 1. b) Statistical results comparing the running wheel and rotarod (in both modalities) using the Friedman repeated measures test in experiment 1. (DOCX)

S3 Table. Statistical results of the Mann Whitney and the Friedman repeated measures ANOVA test on parameters comparing the different groups in experiment 2. (DOCX)

S4 Table. a) Statistical results comparing the signal intensity of the different ROIs from 8 mg/kg group in experiment 2 using the Mann-Whitney U test. b) Statistical results comparing the signal intensity of the different ROIs from 16 mg/kg group in experiment 2 using the Mann-Whitney U test. (DOCX)

S5 Table. a) Statistical results using the Friedman repeated measures ANOVA comparing the signal intensity in the different ROIs activated by sexual behavior in experiment 2. b) Results from the comparisons within groups using the Kruskal Wallis test on ROIs that activates sexual behavior from experiment 2. c) Statistical results comparing by Friedman repeated measures ANOVA the circuits activated by sexual behavior in experiment 2. (DOCX)

Acknowledgments

We thank Leopoldo Gonzalez, Omar González, Ramón Martínez, Martín García, Laura Sánchez and Sandra Hernandez for their excellent technical assistance; Alejandra Castilla León and María A. Carbajo for their support on providing the experimental subjects; Deisy Gasca for the assistance on the rotarod and running wheel tests and Francisco Javier Camacho for the support on the OVX and sexual behavior tests. Alejandro Aguilar-Moreno is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 766439 from CONACYT.

Author Contributions

Conceptualization: Luis Concha, Raúl G. Paredes.

Formal analysis: Juan Ortiz, Sarael Alcauter, Raúl G. Paredes.

Funding acquisition: Raúl G. Paredes.

Investigation: Alejandro Aguilar-Moreno, Juan Ortiz.

Methodology: Alejandro Aguilar-Moreno, Juan Ortiz, Luis Concha, Sarael Alcauter.

Project administration: Raúl G. Paredes.

Resources: Raúl G. Paredes.

Supervision: Raúl G. Paredes.

Writing – original draft: Alejandro Aguilar-Moreno.

Writing – review & editing: Luis Concha, Sarael Alcauter, Raúl G. Paredes.

References

1. Erskine MS. Solicitation Behavior in the estrous female rat: A review. *Hormones and Behavior* 1989; 23:473–502. [https://doi.org/10.1016/0018-506x\(89\)90037-8](https://doi.org/10.1016/0018-506x(89)90037-8) PMID: 2691387
2. Erskine MS, Kornberg E, Cherry JA. Paced copulation in rats: Effects of intromission frequency and duration on luteal activation and estrus length. *Physiology & Behavior*. 1989; 45:33–9.
3. Paredes RG. Opioids and sexual reward. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 2014; 121:124–31. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.11.004> PMID: 24239788
4. Paredes RG. Evaluating the Neurobiology of Sexual Reward. *Ilar Journal*. 2009; 50(1):15–27. <https://doi.org/10.1093/ilar.50.1.15> PMID: 19106449
5. Bedos M, Portillo W, Paredes RG. Neurogenesis and sexual behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology* [Internet]. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2018.02.004> PMID: 29438737
6. Portillo W, Nuñez M, Paredes RG, Bedos M. Neurobiology of reproductive behavior, the role of neurogenesis. In: Choe JC, editor. *Encyclopedia of Animal Behavior*. Seoul, Korea: Academic Press; 2019. p. 274–82.
7. Restrepo D, Arellano J, Oliva AM, Schaefer ML, Lin W. Emerging views on the distinct but related roles of the main and accessory olfactory systems in responsiveness to chemosensory signals in mice. *Hormones and Behavior*. 2004; 46:247–56. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2004.02.009> PMID: 15325226
8. Halpern M, Martínez-Marco A. Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Progress in Neurobiology*. 2003; 70:245–318. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(03\)00103-5](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(03)00103-5) PMID: 12951145
9. Pfau JG, Marcangione C, Smith WJ, Manitt C, Albilal H. Differential induction of Fos in the female rat brain following different amounts of vaginocervical stimulation: modulation by steroids hormones. *Brain Research*. 1996; 741:314–30. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(96\)00985-7](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(96)00985-7) PMID: 9001738
10. Erskine MS. Mating-induced increases in Fos protein in preoptic area medial amygdala of cycling female rats. *Brain Research Bulletin*. 1993; 32:447–51. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(93\)90289-n](https://doi.org/10.1016/0361-9230(93)90289-n) PMID: 8221135
11. Erskine MS, Hanrahan SB. Effects of paced mating on c-fos gene expression in the female rat brain. *Journal of Neuroendocrinology*. 1997; 9:903–12. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.1997.00660.x> PMID: 9468015
12. Pautler RG, Koretsky AP. Tracing odor-induced activation in the olfactory bulbs of mice using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *NeuroImage*. 2002; 16:441–8. <https://doi.org/10.1006/nimg.2002.1075> PMID: 12030829
13. Aoki I, Wu Y-JL, Silva AC, Lynch RM, Koretsky AP. In vivo detection of neuroarchitecture in the rodent brain using manganese-enhanced MRI. *NeuroImage*. 2004; 22:1046–59. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2004.03.031> PMID: 15219577
14. Jasanoff A. Functional MRI using molecular imaging agents. *TRENDS in Neurosciences*. 2005; 28(3):120–6. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.12.007> PMID: 15749164
15. Uludag K, Dubowitz DJ, Buxton RB. Basic Principles of functional MRI. *Clinical MRI*. 2005:250–83.

16. Chuang K-H, Belluscio L, Koretsky AP. In vivo detection of individual glomeruli in the rodent olfactory bulb using manganese enhanced MRI. *NeuroImage*. 2010; 49:1350–6. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.09.060> PMID: 19800011
17. Cahill LS, Steadman PE, Jones CE, Laliberté CL, Dazai J, Lerch JP, et al. MRI-detectable changes in mouse brain structure induced by voluntary exercise. *NeuroImage*. 2015; 113:175–83. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2015.03.036> PMID: 25800209
18. Topping GJ, Yung A, Schaffer P, Hoehr C, Kornelsen R, Kozlowski P, et al. Manganese concentration mapping in the rat brain with MRI, PET, and autoradiography. *American Association of Physicists in Medicine*. 2017; 44:4056–67.
19. Zubcevic J, Watkins J, Perez PD, Colon-Perez LM, Long MT, Febo M, et al. MEMRI reveals altered activity in brain regions associated with anxiety, locomotion, and cardiovascular reactivity on the elevated plus maze in the WKY vs SHR rats. *Brain Imaging and Behavior*. 2017.
20. Almeida-Correa S, Czisch M, Wotjak CT. In vivo visualization of active polysynaptic circuits with longitudinal manganese-enhanced MRI (MEMRI). *Front Neural Circuits*. 2018; 12(42):1–12.
21. Narita K, Kawasaki F, Kita H. Mn and Mg influxes through Ca channels of motor nerve terminals are prevented by verapamil in frogs. *Brain Research*. 1990; 510:289–95. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91379-u](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91379-u) PMID: 2158851
22. Lin Y-J, Koretsky AP. Manganese ion enhances T1-Weighted MRI during brain activation: An approach to direct imaging of brain function. *MRM*. 1997; 38:378–88. <https://doi.org/10.1002/mrm.1910380305> PMID: 9339438
23. Silva AC, Lee JH, Aoki I, Koretsky AP. Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI): methodological and practical considerations. *NMR in Biomedicine*. 2004; 17:532–43. <https://doi.org/10.1002/nbm.945> PMID: 15617052
24. Boretius S, Frahm J. Manganese-Enhanced Magnetic Resonance Imaging. In: Schroder L, Faber C, editors. *In Vivo NMR Imaging Materials and methods*. New York: Humana Press; 2011. p. 531–68.
25. Shukakidze A, Laziev I, Mitagvariya N. Behavioral impairment in acute and chronic manganese poisoning in white rats. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2003; 33(3):263–7. <https://doi.org/10.1023/a:1022103415424> PMID: 12762593
26. Bock NA, Paiva FF, Nascimento GC, Newman JD, Silva AC. Cerebrospinal fluid to brain transport of manganese in a non-human primate revealed by MRI. *Brain Research*. 2008; 1198:160–70. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.12.065> PMID: 18243167
27. Knebel D, Assaf Y, Ayali A. The use of MEMRI for monitoring central nervous system activity during intact insect walking. *Journal of Insect Physiology*. 2018; 108:48–53. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2018.05.003> PMID: 29758239
28. Guilarte TR. Manganese neurotoxicity: new perspectives from behavioral, neuroimaging, and neuropathological studies in human and non-human primates. *Frontiers in aging neuroscience*. 2013; 5(23):1–10.
29. Bouabid S, Tinakoua A, Lakhdar-Ghazal N, Benazzouz A. Manganese neurotoxicity: behavioral disorders associated with dysfunctions in the basal ganglia and neurochemical transmission. *Journal of Neurochemistry*. 2016; 136:677–91. <https://doi.org/10.1111/jnc.13442> PMID: 26608821
30. Gálcsi R, Szalay C, Aradi M, Perlaki V, Pál J, Steier R, et al. Identifying non-toxic doses of manganese for manganese-enhanced magnetic resonance imaging to map brain areas activated by operant behavior in trained rats. *Magnetic Resonance Imaging*. 2017; 37:122–33. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2016.11.017> PMID: 27889621
31. Nielsen BS, Larsen EH, Ladefoged O, Lam HR. Subchronic, low-level intraperitoneal injections of manganese (IV) oxide and manganese (II) chloride affect rat brain neurochemistry. *International Journal of Toxicology*. 2017; 36(3):239–51. <https://doi.org/10.1177/1091581817704378> PMID: 28460583
32. Roth JA. Homeostatic and toxic mechanisms regulating manganese uptake, retention, and elimination. *Biol Research*. 2006; 39:45–57.
33. Corona R, Retana-Marquez S, Portillo W, Paredes RG. Sexual Behavior Increases Cell Proliferation in the Rostral Migratory Stream and Promotes the Differentiation of the New Cells into Neurons in the Accessory Olfactory Bulb of Female Rats. *Front Neurosci*. 2016; 10:48. Epub 2016/03/10. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00048> PMID: 26955325
34. Arzate DM, Portillo W, Corona R, Paredes RG. Repeated paced mating promotes the arrival of more newborn neurons in the main and accessory olfactory of adult female rats. *Neuroscience Letters*. 2013; 232:151–60.
35. Eschenko O, Canals S, Simanova I, Beyerlein M, Murayama Y, Logothetis NK. Mapping of functional brain activity in freely behaving rats during voluntary running using manganese-enhanced MRI:

- Implication for longitudinal studies. *NeuroImage*. 2010; 49:2544–55. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.10.079> PMID: 19896539
36. Paxinos G, Watson C. The rat brain atlas in stereotaxic coordinates. London: Elsevier; 2007.
 37. Treuting PM Jr, THM. Oral cavity and teeth. In: Treuting PM, Dintzis SM, editors. Comparative anatomy and histology A mouse and human atlas: Academic Press; 2012. p. 95–110.
 38. O'Connell LA, Hofmann HA. The vertebrate mesolimbic reward system and social behavior network: A comparative synthesis. *The Journal of Comparative Neurology*. 2011; 519:3599–639. <https://doi.org/10.1002/cne.22735> PMID: 21800319
 39. Calculating Lakens D. and reporting effect size to facilitate cumulative science: a practical primer for t-tests and ANOVAs. *Frontiers in psychology*. 2013; 4(863):1–12.
 40. Ventura-Aquino E, Fernandez-Guasti A. Reduced proceptivity and sex-motivated behaviors in the female rat after repeated copulation in paced and non-paced mating: effect of changing the male. *Physiol Behav*. 2013; 120:70–6. Epub 2013/08/07. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.07.006> PMID: 23916997
 41. Arzate DM, Portillo W, Rodriguez C, Corona R, Paredes RG. Extended paced mating tests induces conditioned place preference without affecting sexual arousal. *Horm Behav*. 2011; 59(5):674–80. Epub 2010/09/08. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.08.016> PMID: 20816964
 42. Camacho FJ, Garcia-Horsman P, Paredes RG. Hormonal and testing conditions for the induction of conditioned place preference by paced mating. *Horm Behav*. 2009; 56(4):410–5. Epub 2009/08/04. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.07.007> PMID: 19646448
 43. Corona R, Camacho FJ, Garcia-Horsman P, Guerrero A, Ogando A, Paredes RG. Different doses of estradiol benzoate induce conditioned place preference after paced mating. *Horm Behav*. 2011; 60(3):264–8. Epub 2011/06/30. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2011.05.013> PMID: 21712041
 44. Kern C, Stanwood G, Smith DR. Pre-weaning manganese exposure causes hyperactivity, disinhibition, and spatial learning and memory deficits associated with altered dopamine receptor and transporter levels. *Synapse*. 2010; 64:363–78. <https://doi.org/10.1002/syn.20736> PMID: 20029834
 45. Agmo A, Paredes R, Fernández H. Differential effects of GABA transaminase inhibitors on sexual behavior, locomotor activity, and motor execution in the male rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1987; 28:47–52. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(87\)90010-4](https://doi.org/10.1016/0091-3057(87)90010-4) PMID: 3116562
 46. Hamm RJ, Pike BR, O'Dell DM, Lyeth BG, Jenkins LW. The rotarod test: An evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*. 1994; 11(2):187–96. <https://doi.org/10.1089/neu.1994.11.187> PMID: 7932797
 47. Peres TV, Eying H, Lopes SC, Colle D, Goncalves FM, Venske DKR, et al. Developmental exposure to manganese induces lasting motor and cognitive impairment in rats. *Neurotoxicology*. 2015; 50:28–37. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.07.005> PMID: 26215118
 48. Petrus E, Saar G, Daoust A, Dodd S, Koretsky AP. A hierarchy of manganese competition and entry in organotypic hippocampal slice cultures. *NMR Biomedicine*. 2021; 34(4):1–15. <https://doi.org/10.1002/nbm.4476> PMID: 33538073
 49. Uselman TW, Barto DR, Jacobs RE, Bearer EL. Evolution of brain-wide activity in the awake behaving mouse after acute fear by longitudinal manganese-enhanced MRI. *NeuroImage*. 2020; 22:1–22. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2020.116975> PMID: 32474079
 50. Arimura D, Shinohara K, Takahashi Y, Sugimura YK, Sugimoto M, Tsurugizawa T, et al. Primary role of the amygdala in spontaneous inflammatory pain-associated activation of pain networks—A chemogenetic manganese-enhanced MRI approach. *Frontiers in Neural Circuits*. 2019; 13:1–21. <https://doi.org/10.3389/fncir.2019.00001> PMID: 30745864
 51. Bade AN, Gendelman HE, Boska MD, Liu Y. MEMRI is a biomarker defining nicotine-specific neuronal responses in subregions of the rodent brain. *Am J Transl Res*. 2017; 9(2):601–10. PMID: 28337287
 52. Jackson SJ, Hussey R, Jansen MA, Merrifield GD, Marshall I, MacLulich A, et al. Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI) of rat brain after systemic administration of MnCl₂: Hippocampal signal enhancement without disruption of hippocampus-dependent behavior. *Behavioural Brain Research*. 2011; 216:293–300. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.08.007> PMID: 20713092
 53. Yu X, Wadhvani YZ, Sanes DH, Turnbull DH. In vivo auditory brain mapping in the mice with Mn-enhanced MRI. *Nat Neuroscience*. 2005; 8(7):961–8. <https://doi.org/10.1038/nn1477> PMID: 15924136
 54. Rowe DW, Erskine MS. c-Fos proto-oncogene activity induced by mating in the preoptic area, hypothalamus and amygdala in the female rat: role of afferent input via pelvic nerve. *Brain Research*. 1993; 621:25–34. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90294-w](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90294-w) PMID: 8221071
 55. Flanagan-Cato LM, McEwen BS. Pattern of Fos and Jun expression in the female rat forebrain after sexual behavior. *Brain Research*. 1995; 673:53–60. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)01395-x](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)01395-x) PMID: 7757479

56. Polston EK, Erskine MS. Patterns of induction of the immediate-early genes *c-fos* and *egr-1* in the female rat brain following differential amounts of mating stimulation. *Behavioral Neuroendocrinology*. 1995; 62:370–84. <https://doi.org/10.1159/000127027> PMID: [8544951](#)
57. Coolen LM, Peters HJPW, Veening JG. Fos immunoreactivity in the rat brain following consummatory elements of sexual behavior: a sex comparison *Brain Research*. 1996;738.
58. Ventura-Aquino E, Paredes RG. Sexual behavior in rodents: Where do we go from here? *Horm Behav*. 2020; 118:104678. Epub 2020/01/14. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2020.104678> PMID: [31927024](#)
59. Brunquell CL, Hernandez R, Graves SA, Smit-Ostad I, Nickles RJ, Cai W, et al. Uptake and retention of manganese contrast agents for PET and MRI in the rodent brain. *Contrast media & molecular imaging*. 2016; 11:371–80.
60. Febo M, Segarra AC, Stolberg TL, Ferris CF. BOLD signal response to cocaine varies with sexual receptivity in female rats. *Neuroreport*. 2011; 22(1):19–22. <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e3283416881> PMID: [21048520](#)
61. Dhawan JK, Kumar VM, Govindaraju V, Raghunathan P. Changes in magnetic resonance imaging and sex behavior after 6-OHDA injection in the medial preoptic area. *Brain Research Bulletin*. 1998; 45(3):333–9. [https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(97\)00404-8](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(97)00404-8) PMID: [9510428](#)
62. Kumar VM, John J, Govindaraju V, Khan NA, Raghunathan P. Magnetic resonance imaging of NMDA-induced lesion of the medial preoptic area and changes in sleep, temperature and sex behavior. *Neuroscience Research* 1996; 24(3):207–14. [https://doi.org/10.1016/0168-0102\(95\)00995-7](https://doi.org/10.1016/0168-0102(95)00995-7) PMID: [8815441](#)