



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

# Doctorado en Ciencias Biomédicas

Instituto de Neurobiología

Tesis doctoral

**“Evaluación de la conducta sexual masculina en ratas con lesión del tegmento dorsolateral o del campo tegmental central”**

Presenta: **M. en C. José Carmen Romero Carbente**

Tutor: **Dr. Raúl Gerardo Paredes Guerrero**

Enero de 2007



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.

## **Agradecimientos**

**Al Dr. Raúl Paredes por aceptarme en su laboratorio y guiarme en mi formación profesional. También por hacerme ver los resultados que en un inicio consideré poco importantes como verdaderos eslabones que pueden cambiar una concepción vigente.**

**A los investigadores que han revisado el escrito final y a aquellos que en algún momento dedicaron parte de su tiempo en la revisión de los experimentos que se desarrollaron en esta tesis: Alonso Fernández Guasti, Javier Velázquez Moctezuma, José Ramón Eguibar Cuenca, Jorge Larriva Sahd, Jarge Manzo Denes, Gabriela Morali de la Brena, Gabriela Rodríguez Manzo y Marco Antonio Sanchez.**

**Por sus atenciones e invaluable amistad a mis compañeros y amigos del laboratorio: Gina, Arturo, Patricia, Wendy, Mac Gregor, Lucy, Rebeca, Fernando y Emilio. A mis amigos externos al laboratorio: Victor, Gustavo y Claudita.**

**A mi amigo Francisco Camacho Barrios por su apoyo técnico en el laboratorio y a la señora Esther Martínez por el cuidado de los animales.**

**A Nydia Hernández, Pilar Galarza y Rafael Silva, María de Lourdes Lara, Omar González y a Martín García por su asistencia técnica en las áreas de imágenes, biblioteca, videoconferencias, cómputo y bioterio, respectivamente.**

**Definitivamente agradezco de manera especial a Leonor Casanova, jefa de enseñanza, quien más que una profesional es una persona muy humana, gracias Leo.**

**Invaluable el apoyo económico, y por ello el agradecimiento, a las dependencias que apoyan la formación de investigadores, el Consejo Nacional del Ciencia y Tecnología y a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM, quien a través de la beca número 153836 y el complemento de beca, respectivamente, hicieron posible la realización de esta tesis.**

## **Dedicatorias**

**Este trabajo lo dedico a mi esposa Naye quien con entusiasmo me impulsa a crecer como persona y como profesionista.**

**A mis padres Alejandra Celerina y José Carmen, mis ejemplos de lucha, paciencia y cariño.**

**A mis hermanos que tanto quiero y aprecio: Fide, Irma, Beto, For, Cele, Joel, Delia, Angy, Jenny, Charly, Mary y Marco.**

## ÍNDICE GENERAL

Índice general.....	i
Índice de figuras.....	iv
Índice de tablas.....	vi
Lista de abreviaturas.....	vii
Resumen.....	viii
Abstract.....	x
<b>I. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>II. Antecedentes.....</b>	<b>3</b>
<b>1. Conducta sexual masculina.....</b>	<b>3</b>
1.1 Generalidades de la conducta sexual masculina.....	3
1.2 Conductas precopulatorias.....	3
1.3 Ejecución de la cópula.....	3
1.4 Conductas post copulatorias.....	5
1.5 Motivación sexual masculina.....	6
<b>2. Circuitos neuronales que controlan la conducta sexual masculina.....</b>	<b>9</b>
2.1 Metodos de investigación de circuitos neuronales.....	9
2.2 Ventajas del ácido quinolínico como herramienta para lesiones neurotóxicas.....	9
2.3 Sistema de proyección vomeronasal.....	11
Órgano vomeronasal.....	13
Bulvo olfatorio accesorio.....	15
Amígdala medial .....	16
Núcleo lecho de la estría terminal.....	17
Área preóptica medial .....	19
Otras estructuras implicadas en el control de la cópula.....	24
2.4 Participación del tegmento dorsolateral en el control de la conducta sexual masculina.....	26

2.5 Participación del campo tegmental central en el control de la conducta sexual masculina.....	27
<b>III. Planteamiento del problema.....</b>	<b>30</b>
<b>IV. Hipótesis generales.....</b>	<b>32</b>
<b>V. Objetivos generales.....</b>	<b>33</b>
<b>VI. Métodos generales.....</b>	<b>34</b>
<b>1. Sujetos.....</b>	<b>34</b>
<b>2. Cirugías.....</b>	<b>34</b>
<b>3. Conducta sexual.....</b>	<b>35</b>
<b>4. Conducta sociosexual.....</b>	<b>35</b>
<b>5. Preferencia de pareja.....</b>	<b>35</b>
<b>6. Ejecución motora.....</b>	<b>36</b>
<b>7. Inmunocitoquímica.....</b>	<b>37</b>
<b>8. Análisis estadístico.....</b>	<b>38</b>
<b>VII. Experimento 1.....</b>	<b>39</b>
<b>1. Hipótesis particular.....</b>	<b>39</b>
<b>2. Objetivos particulares.....</b>	<b>39</b>
<b>3. Métodos específicos.....</b>	<b>40</b>
3.1 Sitios de lesión.....	40
3.2 Histología.....	40
<b>4. Resultados histológicos.....</b>	<b>41</b>
<b>5. Resultados conductuales.....</b>	<b>45</b>
5.1 Porcentajes de monta, intromisión y eyaculación.....	45
5.2 Número y latencia de monta e intromisión.....	48
5.3 Conducta sociosexual en sujetos lesionados en el TDL.....	49
5.4 Preferencia de pareja.....	51

5.5 Coordinación motora en sujetos lesionados en el tegmento dorsolateral.....	52
<b>6. Discusión.....</b>	<b>54</b>
<b>VIII. Experimento 2.....</b>	<b>59</b>
<b>1. Hipótesis particular.....</b>	<b>59</b>
<b>2. Objetivos particulares.....</b>	<b>59</b>
<b>3. Métodos específicos.....</b>	<b>60</b>
3.1 Motivación sexual incentiva.....	60
3.2 Sitios de lesión.....	60
3.3 Histología.....	61
<b>4. Resultados histológicos.....</b>	<b>61</b>
<b>5. Resultados conductuales.....</b>	<b>64</b>
5.1 Porcentajes de machos que mostraron conducta sexual.....	64
5.2 Frecuencia y latencia de monta e intromisión.....	67
5.3 Frecuencia de las conductas sociosexuales.....	68
5.4 Duración de las conductas sociosexuales .....	70
5.5 Preferencia de pareja.....	71
5.6 Motivación sexual incentiva.....	71
5.7 Ejecución motora.....	72
<b>6. Discusión.....</b>	<b>74</b>
<b>IX. Discusión general.....</b>	<b>78</b>
<b>X. Bibliografía.....</b>	<b>83</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

1. Etograma hipotético de la ejecución temporal de la conducta sexual de la rata macho.....	5
2. Sistema de proyección vomeronasal y olfatorio principal en roedores.....	12
3. Modelo propuesto para explicar la motivación sexual incentiva.....	23
4. Fotomicrografía de cortes coronales del cerebro de un animal inyectado con solución vehículo y uno inyectado con ácido quinolínico.....	42
5. Fotografía que muestra la inmunorreactividad a Neu-N en un animal inyectado con solución vehículo y uno con lesión bilateral del TDL.....	43
6. Representación esquemática del área común lesionada en animales inyectados en el TDL con ácido quinolínico.....	44
7. Porcentaje de ratas que desplegaron monta, intromisión o eyaculación antes y después de ser lesionados con ácido quinolínico.....	47
8. Índice de preferencia en sujetos con lesión neurotóxica del tegmento dorsolateral.....	52
9. Número de caídas registradas en le rota rod en animales lesionados en el TDL.....	53
10. Fotomicrografías de cortes coronales del mesencéfalo donde se muestran la inmunorreactividad a la proteína glial ácido fibrilar en el campo tegmental central en una rata inyectada con solución vehículo o ácido quinolínico.....	62
11. Fotomicrografía de cortes coronales del mesencéfalo donde se muestra la inmunorreactividad a la proteína neuronal nuclear en el campo tegmental central en una rata inyectada con solución vehículo o con ácido quinolínico.....	63
12. Porcentaje de machos lesionados en el CTC que mostraron monta, intromisión y eyaculación.....	66

13. Índice de preferencia de pareja en sujetos lesionados neurotóxicamente en el campo tegmental central.....	71
14. Índice de motivación sexual incentiva en animales con lesión bilateral del CTC.....	72
15. Número de caídas en el rota rod en animales lesionados bilateralmente del CTC.....	73
16. Esquema de un corte sagital de cerebro de rata que muestra la posición de núcleos posteriores al APM y que pueden estar involucrados con la regulación de la cópula.....	81

## ÍNDICE DE TABLAS

1. Número de neuronas detectadas con inmunocitoquímica para núcleos neuronales en sujetos control, con lesión bilateral, parcial y con lesión fuera del TDL.....	45
2. Frecuencias y latencias de monta e intromisión en grupos lesionados en el TDL.....	49
3. Frecuencia de conductas sociosexuales en animales lesionados en el TDL.....	50
4. Duración de conductas sociosexuales en animales lesionados en el TDL.....	51
5. Cuantificación y porcentaje de neuronas en animales lesionados del CTC.....	64
6. Conducta sexual en ratas macho lesionadas bilateralmente del CTC.....	68
7. Frecuencia de interacciones sociosexuales en animales con lesión bilateral del CTC.....	69
8. Duración de interacción sociosexual en animales lesionados del CTC.....	70

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

3V= Tercer ventrículo	LI= Latencia de intromisión
4V= Cuarto ventrículo	LM= Latencia de monta
AME= Amígdala medial	NLET= Núcleo lecho de la estría terminal
APM= Área preóptica medial	NMDA= N-metil-D-aspartato
BOA= Bulbo olfatorio accesorio	NO= Núcleo oscuro
BOP= Bulbo olfatorio principal	NPP= Núcleo peripeduncular
ca= Comisura anterior	Neu-N= Proteína neuronal
CGRP= Proteína relacionada al gen de la calcitonina	NS= Núcleo subtalámico
cp= comisura posterior	OVN= Órgano vomeronasal
CRR= Campo retrorrubral	PGC= Núcleo paragigantocelular
CTC= Campo tegmental central	R= Núcleo rojo
DAB= Diaminobencidina	RG= Núcleo reticular gigantocelular ventral
FRV= Formación reticular ventral	RGV= Núcleo reticular gigantocelular ventral
GABA= Ácido gama amino butírico	RM= Rafé magno
GFAP= Proteína glial ácido fibrilar	SPFp= Núcleo talámico subparafascicular parvocelular
HA= Hipotálamo anterior	TDL= Tegmento dorsolateral
HL= Hipotálamo lateral adyacente	TPP= Núcleo tegmental pedúnculopontino
IPE= Intervalo post eyaculatorio	ZI= Zona incerta
LE= Latencia de eyaculación	

## RESUMEN

Varias líneas de investigación han tratado de determinar las estructuras del sistema nervioso central que controlan la cópula. A la fecha se conoce, entre ellas, un circuito neuronal llamado sistema de proyección vomeronasal. Este circuito neuronal participa en la detección y procesamiento de olores sexualmente relevantes que contribuyen a la motivación sexual. Las estructuras que componen dicho circuito incluyen el órgano vomeronasal, el bulbo olfatorio accesorio, el núcleo de la cama de la estría terminal, la amígdala en su parte medial y la estructura que comprende al área preóptica medial del hipotálamo anterior (APM). El APM tiene conexiones con el tegmento dorsolateral (TDL) y el campo tegmental central (CTC). El TDL y el CTC se activan con la cópula, y se ha visto que la lesión electrolítica del TDL o la inactivación con lidocaina del CTC inhiben la conducta sexual masculina, por lo que se ha sugerido que esas estructuras son fundamentales para el despliegue del apareamiento.

El objetivo de este proyecto fue saber si la lesión neurotóxica bilateral del TDL (experimento 1) y del CTC (experimento 2) afecta la expresión de la conducta sexual masculina. También evaluamos la preferencia de pareja, conductas sociosexuales y la ejecución motora. Esto para tratar de determinar si estas estructuras controlan la motivación o la ejecución de la cópula.

Los resultados del primer experimento demuestran que la lesión del TDL afectó la conducta sexual únicamente en la primera sesión post lesión, mientras que en las sesiones dos y tres post lesión el porcentaje de sujetos que copularon fue similar a los sujetos control. La lesión no afectó la preferencia de pareja ni la ejecución motora.

En el segundo experimento encontramos que la lesión del CTC inhibió la cópula únicamente en dos sesiones post lesión regresando a niveles del grupo control en la tercera

prueba post lesión. No encontramos cambios en la preferencia de pareja pero sí observamos alteraciones en la ejecución motora.

Los resultados de ambos experimentos sugieren que las neuronas del TDL y del CTC no son indispensables en la ejecución de la conducta sexual masculina en la rata, dado que la lesión neurotóxica bilateral de esas estructuras no inhibe permanentemente la expresión de la cópula. Estos datos sugieren que los axones que cruzan por el TDL y el CTC llevan a estructuras posteriores la información del control de la cópula. Ahora es necesario determinar qué estructuras posteriores al TDL y al CTC y que reciben conexiones del APM están involucradas en el control de la conducta sexual masculina.

## ABSTRACT

Different lines of evidence have described brain structures involved in control of male sexual behavior. The vomeronasal projection system is the main neuronal pathway implicated in detection and processing of sexually relevant olfactory cues. This system includes the vomeronasal organ, the accessory olfactory bulb, the bed nucleus of the stria terminalis, the medial amygdala and the medial preoptic area (APM). The APM sends projections to the dorsolateral tegmentum (TDL) and the central tegmental field (CTC). Both of these structures express the fos protein after the mating suggesting that they are activated and participate in the control of mating. Indeed, it has been shown that electrolytic lesions of the TDL or temporal inactivation, with lidocaine, of the CTC abolish male sexual behavior.

The main goal of this project is to determine if bilateral neurotoxic lesions of the TDL (experiment 1) or CTC (experiment 2) abolish mating. This would let us determine if the neurons within these regions or the axons passing through are involved in the control of male sexual behavior. We also tested sociosexual behaviors, partner preference and motor execution in order to evaluate the role of these structures in the sexual motivation and motor execution.

The bilateral TDL lesion reduced the percentage of males that mated in the first session post lesion. However, in the second and third post lesion session these percentages were similar to the control group. No effects were observed on partner preference and motor execution. The bilateral CTC lesion reduced the percentage of males that display male sexual behavior in the first and second post lesion sessions. In the third post lesion session most of the animals displayed sexual behavior in levels similar to the control group. The lesion did not affect partner preference but produced alterations in motor execution. That is, the lesioned animals showed severe motor deficits.

Together, these data indicate that neurons within the TDL and CTC are not important in the control of male sexual behavior but that axons passing through these structures carry on the information

necessary to display sexual behavior. Other brain regions located behind the TDL and CTC should be evaluated as possible candidates involved in the control of male sexual behavior.

# **I. Introducción**

El único mecanismo natural que permite a las especies de vertebrados superiores dejar descendencia es el apareamiento, cópula o conducta sexual (Crews, 1998). A pesar de que la conducta sexual es indispensable para la supervivencia de las especies, no lo es para la supervivencia del individuo como lo es la ingesta de comida y agua, porque nadie muere por dejar de copular (Beach y Jordan, 1956; Pfaus, 1999). La ejecución de la cópula no tiene otra finalidad mas que su propia ejecución (Agmo, 1999).

A pesar de que la conducta sexual se ha estudiado de manera experimental por más de un siglo (Agmo y Pfaff, 1999), y de que los diferentes enfoques incluyen técnicas de biología molecular, fisiología, neuroanatomía y de conducta, no se ha logrado explicar, desde un punto de vista integral, como el sistema nervioso central controla el despliegue de la conducta sexual.

A lo largo del estudio de la biología de la reproducción se ha analizado la forma en que se reproducen muchas especies de animales de todos los reinos, pero es en los roedores en donde se ha generado la gama de conocimientos más amplia en los diferentes niveles de estudio (Crews, 1998), siendo la rata el roedor que más se emplea como sujeto experimental (Agmo y Pfaff, 1999).

El estudio de la conducta sexual en la rata tuvo sus orígenes en los primeros años del siglo pasado, y fue a mediados de ese siglo en donde se observó un crecimiento exponencial en el estudio tanto de la conducta sexual masculina como de la conducta sexual femenina. Los trabajos de Larsson (1956) y de Beach (1956) marcaron el inicio del estudio del control neural y de los factores hormonales que controlan la cópula y la motivación sexual (Agmo y Vega Matuszczyk, 2003; Pfaus, 1999).

La conducta sexual en ratas macho y hembras ha sido ampliamente descrita, sin embargo, las redes neuronales que comandan dicha conducta son mejor conocidas en la rata macho y como haré notar posteriormente, en este trabajo pretendemos conocer si un par de estructuras mesencefálicas (el tegmento dorsolateral y el campo tegmental central) son estructuras de salida de la información

procesada por el sistema de proyección vomeronasal, que es imprescindible para el despliegue de la cópula en la rata macho.

## **II. Antecedentes**

### **1. Conducta sexual masculina**

#### 1.1 Generalidades de la conducta sexual masculina

Para su estudio la conducta sexual de la rata se ha dividido en tres categorías: 1) las que se ejecutan durante el reconocimiento de pareja conocidas como precopulatorias; 2) las que involucran el contacto de los genitales llamadas copulatorias; y 3) conductas postcopulatorias en donde se incluye vocalizaciones ultrasónicas, el descanso y el acicalamiento de los genitales por tiempo prolongado (Hlinack, 1990). Esta categorización ha permitido estudiar la conducta sexual masculina en dos componentes, como lo son la ejecución de la cópula *per se* y la motivación sexual (Agmo, 1999; Pfaus, 1999).

#### 1.2 Conductas precopulatorias

Las conductas precopulatorias son aquellas que un macho realiza con el fin de reconocer a una hembra sexualmente receptiva con la cual pueda copular. Se involucran por lo tanto conductas de exploración como son la olfacción, el apoyo en las patas posteriores o erguido, las persecuciones que el macho realiza para alcanzar a la hembra y copular, el aseo del cuerpo, el autoaseo de genitales y el aseo realizado sobre la hembra. Estas conductas precopulatorias son determinantes en la interacción sexual de la pareja (Dvorska y cols., 1986).

#### 1.3 Ejecución de la cópula

Para que se despliegue el patrón motor que caracteriza la conducta sexual masculina se requiere de que el animal cuente con tres elementos: 1) un componente motor que involucra los músculos que pueden hacerlo llegar a la hembra con la que copula; 2) un componente genital externo para poder

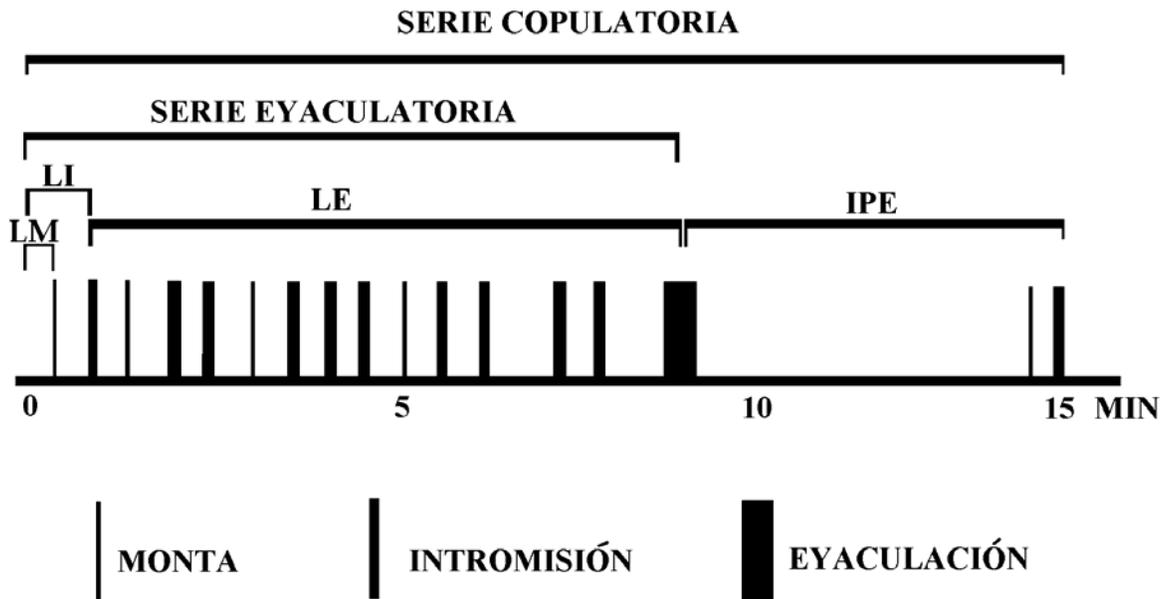
llevar a cabo la intromisión; y 3) un componente genital interno conformado por el sistema nervioso autónomo que controla la emisión seminal y la eyaculación (Morali y cols., 2003).

En el despliegue de la conducta sexual masculina de la rata se pueden observar tres componentes motores: la monta, la intromisión y la eyaculación (Larsson, 1956; Meisel y Sachs, 1994; Sachs y Barfield, 1976). Estos patrones motores son desplegados por machos adultos en respuesta a estímulos olfatorios sexualmente relevantes (feromonas), estímulos visuales y estímulos auditivos de una hembra receptiva presente (Meisel y Sachs, 1994). La consumación o ejecución de la cópula está dada por la realización recurrente de montas e intromisiones hasta que el animal eyacula, y en conjunto esos eventos son denominados serie eyaculatoria (Larsson, 1956; Sachs y Barfield, 1976). A la serie eyaculatoria mas la primera intromisión posterior a una eyaculación se le nombra serie copulatoria (Meisel y Sachs, 1994).

A pesar de que la monta, intromisión y la eyaculación requieren que el macho trepe sobre la hembra, palpe con sus patas delanteras los flancos de la hembra y el contacto de sus genitales, cada uno de esos patrones motores tiene características propias, principalmente en la forma en que desmontan de la hembra. Mientras que la desmonta es lenta si no hubo penetración del pene, en el caso de que el animal logre intrometer la desmonta es brusca, y en el caso de la eyaculación la desmonta es lenta pero precedida por una flexión que el macho hace sobre la hembra al momento de eyacular (Larsson, 1956; Meisel y Sachs, 1994; Sachs y Barfield, 1976).

La monta e intromisión se ejecutan con intervalos de entre 30 y 120 segundos, y después de que el animal logra intrometer entre 7 y 13 veces se produce el reflejo eyaculatorio (Larsson, 1956; Meisel y Sachs, 1994; Sachs y Barfield, 1976), tal como se representa en la figura 1.

# PATRÓN COPULATORIO DE LA RATA



**Figura 1. Etograma hipotético de la ejecución temporal de la conducta sexual de la rata macho.** Una serie eyaculatoria incluye las latencias de monta, intromisión y eyaculación, mientras que en una serie copulatoria se anexa el intervalo post eyaculatorio. Los parámetros para evaluar la ejecución están dados por el número de montas e intromisiones pre eyacatorias (Modificado de Retana-Márquez y Velázquez-Moctezuma, 1995).

## 1.4 Conductas post copulatorias

Las conductas post copulatorias son aquellos eventos que se realizan después de la eyaculación, destacándose entre estas el aseo genital y el descanso. Dado que el aseo post eyaculación no parece tener ninguna función mas que de limpieza, no se ha estudiado como evento importante. Junto con las conductas post copulatorias se presenta un periodo en el que se emiten vocalizaciones ultrasónicas de alrededor de 22 Khz (Karen y Barfield, 1975), el cual es conocido como periodo refractario absoluto (Mos y cols., 1991). Estas vocalizaciones son emitidas inmediatamente después de la eyaculación. Posterior al periodo refractario absoluto sigue una fase de inactividad vocal conocida como periodo

refractario relativo que termina cuando el animal reinicia la cópula. El periodo refractario absoluto es inmodificable, porque ninguna manipulación empleada con el fin de reducirlo ha funcionado, mientras que el periodo refractario relativo puede ser reducido si se aplica un estímulo doloroso de bajo umbral, se cambia a la hembra receptiva por otra o administrando drogas como las dopaminérgicas (Cagiano y cols., 1989), lo que se refleja en el reinicio más rápido de la cópula (Meisel y Sachs, 1994). Dado que el periodo refractario relativo es modificable se le ha asociado directamente con la motivación sexual.

### 1.5 Motivación sexual masculina

Se han propuesto dos teorías para tratar de explicar la motivación sexual. Una sugiere que las ratas macho tienen la capacidad de reconocer el estado de receptividad de una hembra de manera innata, lo que implica que los machos nacen con un mecanismo neuronal capaz de responder a información sensorial sexualmente relevante para la cópula (Agmo, 1999; Agmo, 2002). Este fue sugerido inicialmente por Beach (1942; citado en Lopez y cols., 1999), quien demostró que tanto machos sexualmente inexpertos como machos sexualmente expertos prefieren a una hembra receptiva que a una no receptiva, lo que sugiere que esta motivación por la hembra receptiva es innata. Apoyan a esta hipótesis datos obtenidos en machos sexualmente inexpertos quienes muestran erecciones del pene cuando se les pone a oler secreciones vaginales de hembra receptiva, tal cual sucede con machos sexualmente expertos (Sachs, 1997). Por otra parte, empleando una cámara de dos niveles se demostró que tanto los sujetos sexualmente inexpertos como los expertos incrementan de manera similar el número de visitas a cada nivel cuando previo a la prueba se puso una hembra sexualmente receptiva (Van Furth y Van Ree, 1996), sugiriendo que existen señales olfatorias precopulatorias que de manera incondicional activan los sistemas apetitivos para promover la ejecución de la conducta sexual (Lopez y cols., 1999).

Una segunda propuesta para entender la motivación sexual sostiene que los machos no nacen con un mecanismo que promueve la motivación sexual, sino que con la experiencia sexual un macho

asocia los olores de la hembra con el bienestar que le produce la cópula, y por lo tanto aprende que un olor en particular está asociado con un estado de bienestar (Pfaus, 1996). Por otra parte, diversos grupos de investigación han sugerido que las ratas macho sexualmente inexpertas no muestran preferencia por olores de una hembra en estro (Carr y cols., 1965; Carr y cols., 1966; Carr y cols., 1962; Lydell y Doty, 1972; Stern, 1970).

A la fecha no existe una definición clara de motivación sexual (Paredes, 2003). Las aseveraciones sobre lo que es motivación van desde las más generales hasta aquellas que tratan de definir de una manera más precisa lo que significa motivación. La definición de motivación más amplia que se ha dado se refiere a la fuerza interna que lleva a un organismo a ejecutar una determinada respuesta (Escobar-Briones, 2002). En el caso de la conducta sexual se han dado varias alternativas, así por ejemplo, desde mediados del siglo pasado se propuso que la motivación sexual es la excitación fisiológica y psicológica del organismo en presencia de un incentivo sexual hasta que se alcanza un umbral copulatorio, y es generado por un sistema de despertar sexual (Beach y Jordan, 1956). Otros sugieren que es una energía interna que se crea con la tensión sexual y se libera con el orgasmo, por lo tanto está en relación directa con la cantidad de placer (Reich, 1978; citado en Pfaus, 1999). Por otra parte, también se ha comparado la motivación sexual con la motivación apetitiva o como ahora se le conoce “motivación incentiva”, en donde se tiene como principal argumento el que la estimulación genital y el orgasmo son de manera innata placenteros, por lo que estímulos asociados con esos eventos producen propiedades afectivas positivas y subsecuentemente pueden ser capaces de producir la motivación sexual (Hardy, 1964). En términos generales, dentro de las definiciones que se han dado para motivación sexual se hace referencia al proceso que conduce a un animal a tener contacto sexual con otro (Agmo, 1999)

En el estudio de la conducta sexual masculina se ha tomado de manera clásica la latencia de monta, intromisión y eyaculación para la evaluación de la motivación sexual (Larsson, 1956), aunque también se ha incluido la duración del intervalo post-eyaculatorio (Meisel y Sachs, 1994). La

evaluación de la motivación sexual con esos parámetros ha sido tema de ardua discusión dado que estas variables están directamente relacionadas con la capacidad motriz de los animales y alguna alteración de ésta puede incrementar esos valores lo que puede confundirse al evaluar la motivación sexual (Paredes y Agmo, 2004).

Durante la década de los 80s del siglo pasado se sugirió otra alternativa para estudiar la motivación sexual, la que se basa en el análisis de las conductas sociosexuales como lo son la frecuencia de persecución hacia la hembra, la exploración de los genitales, el acicalamiento sobre la hembra, husmeo, erguidos y el tiempo de reposo como índice de motivación (Dvorska y cols., 1986; Hlinak, 1986; Hlinak, 1990a; Hlinak, 1990b), siendo más sensible al estado motivacional la duración y frecuencia de persecución, ya que es ahí en donde se notan diferencias al comparar la conducta sociosexual de un animal sexualmente inexperto y un animal sexualmente experto en una prueba de cópula (Agmo, 1999). Este método permite disociar alteraciones motoras de efectos motivacionales y ha sido ampliamente utilizado por diversos grupos de investigación (ver revisión Paredes, 2003).

Otro método para evaluar la motivación sexual es la prueba de preferencia de pareja. En esta prueba la motivación sexual se determina cuantificando el tiempo que un macho interactúa con una hembra receptiva y con una hembra no receptiva. Esta prueba fue validada cuando se demostró que el tiempo de permanencia de un macho castrado con una hembra receptiva y con una no receptiva es igual, lo que coincide con la ausencia de actividad copulatoria. Con estos datos se asumió una extinción de conducta sexual asociada a una reducción de la motivación sexual (Edwards y Einhorn, 1986).

## **2. Circuitos neuronales que controlan la conducta sexual masculina**

### **2.1 Métodos de investigación de circuitos neuronales**

Para identificar las estructuras que controlan la conducta sexual se han utilizado diferentes métodos entre ellos las lesiones electrolíticas, lesiones cortando vías axonales con navajas (Paxinos, 1973; Paxinos y Bindra, 1973), lesiones con radiofrecuencia (Van De Poll y Van Dis, 1979), o a través de la inyección de sustancias neurotóxicas (Bjorklund y cols., 1986). También se ha empleado el registro electrofisiológico para evaluar la participación de núcleos neuronales en el control de la conducta sexual. Se ha registrado actividad eléctrica de campo en diversas estructuras cerebrales, principalmente en el sistema límbico (Jiang y Behbehani, 2001; Merari y Ginton, 1975; Okada y cols., 1991), o en estructuras mesencefálicas cuando la rata macho esta copulando (Hernandez-Gonzalez y cols., 1997; Shimura y Shimokochi, 1990; Shimura y cols., 1994).

El uso de trazadores neuronales como la peroxidasa de rábano, la leucoaglutinina de *Phaseollus vulgaris*, la subunidad *B* de la toxina de cólera o el dextrano amino biotilado (Lanciego y Wouterlood, 2000), que combinados con la técnica de inmunocitoquímica, principalmente para detectar receptores a testosterona y estradiol o a proteínas asociadas a actividad neuronal (fos, jun, erg), han permitido conocer si un grupo de neuronas en particular se activan durante la cópula y si sus proyecciones activan a las neuronas con las que hacen sinapsis durante el despliegue de la conducta sexual. Todo esto en conjunto ha permitido sugerir el acoplamiento de un grupo de estructuras que forman una red neuronal involucrada en el control de la cópula conocida como circuito o sistema de proyección vomeronasal.

### **2.2 Ventajas del ácido quinolínico como herramienta para lesiones neurotóxicas**

La práctica de lesiones neurotóxicas para tratar de indagar a cerca del papel de una estructura en particular es de vital importancia dado que se daña en menor proporción a los axones de paso comparado con las lesiones electrolíticas ó de radio frecuencia (Winn, 1991). Se han empleado diversas

substancias que inhiben temporalmente la actividad eléctrica de una neurona, tal como lo hace la lidocaína, a través del bloqueo de canales de sodio impide la funcionalidad de la neurona (Sandkuhler y Gebhart, 1991). Otras drogas producen daño neuronal permanente entre las que se tienen: la 6-hidroxi dopamina y la ión 1-metil-4-fenilpirinidión que dañan sólo neuronas catecolaminérgicas (dopaminérgicas y noradrenérgicas); la 5,7-dihidroxitriptamina que sólo afecta a las neuronas serotoninérgicas; la L-aspartato y la L-glutamato que en dosis muy elevadas que junto con el ácido quiscualico, el ácido kaínico (dosis <3 nmol, 0.5 ml), el ácido iboténico, el N-metil-Daspartato y el ácido quinolínico produce la muerte de neuronas glutamatérgicas (Sirinathsinghji, 1991; Winn, 1991).

El neurotóxico ácido quinolínico es sintetizado a partir de L-triptofano por la vía de síntesis de las kinureninas, las que son un metabolito del triptofano y las cuales bloquean con una alta afinidad el sitio de unión a glicina (Nemeth y cols., 2005). El ácido quinolínico es un neurotóxico endógeno que se encuentra en muy bajas concentraciones en el cerebro, aproximadamente 50-100 pmoles/g (Cooper y cols., 2003). La toxicidad del ácido quinolínico es mediada a través de los receptores NMDA, el que es un canal iónico activado por ligando. Estos receptores son ampliamente distribuidos en el cerebro y médula espinal, aunque la mayor concentración se encuentra en la corteza cerebral e hipocampo (Cooper y cols., 2003).

La neurotoxicidad del ácido quinolínico es debida a una hiperactivación de los receptores NMDA, lo que trae como consecuencia la producción de radicales libres y un aumento en los niveles de estrés oxidativo y en la peroxidación lipídica (Rios y Santamaria, 1991). También, parece producir una sobre activación de los receptores NMDA que trae como consecuencia un incremento de iones de calcio intracelular de las neuronas, produciendo una hiperactivación de proteasas y fosfolipasas desencadenando la apoptosis (Nemeth y cols., 2005; Winn, 1991).

El ácido quinolínico produce muerte de neuronas que tienen receptores NMDA pero no daña los axones que pasan por el sitio de lesión (Bjorklund y cols., 1986), además, sus efectos no parece restringirse al sitio de inyección. Estas dos características no las tienen otras neurotoxinas como el

ácido kaínico, cuya inyección generalmente afecta otras estructuras asociadas con el sitio de inyección. Por ejemplo, la inyección de ácido kaínico en el hipotálamo lateral también afecta a la amígdala, núcleo subtalámico y al núcleo talámico ventral (ver Winn, 1991). Por otra parte, la inyección de ácido iboténico en el septum medial además de producir muerte neuronal produce daño en los axones de paso (ver Winn, 1992). Con todo lo anteriormente expuesto se puede advertir que el uso del ácido quinolínico es una buena alternativa para producir la muerte de cuerpos neuronales sin afectar los axones de paso.

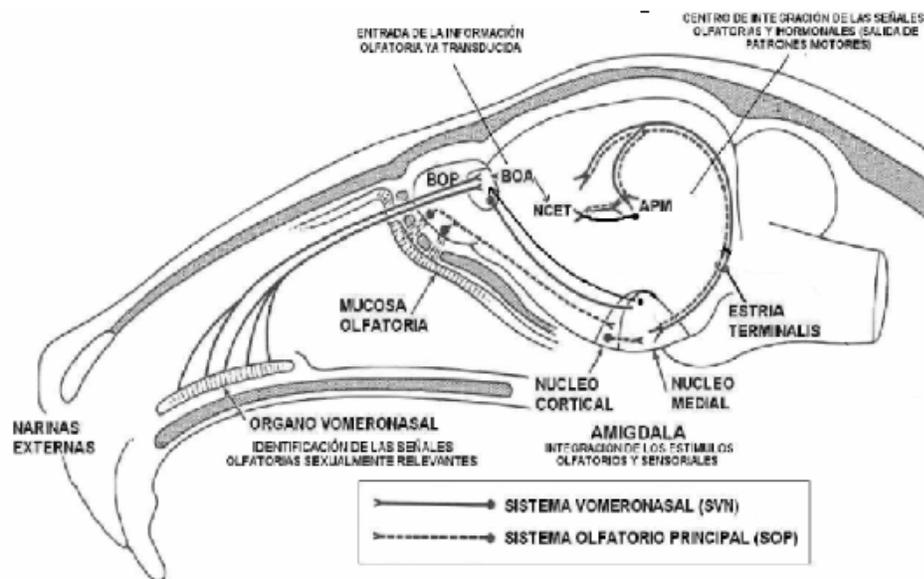
### 2.3 Sistema de proyección vomeronasal

El sistema de proyección vomeronasal está conformado por el órgano vomeronasal u órgano de Jacobson (OVN), el bulbo olfatorio accesorio (BOA), el núcleo lecho de la estria terminal (NLET), la amígdala medial (AME) (Sequeira y cols., 2000) y el área preóptica medial (APM) (Meredith, 1986; Scalia y Winans, 1975; Sequeira y cols., 2000). En la figura 2 se muestra la organización del sistema o circuito de proyección vomeronasal. El órgano vomeronasal es una estructura cilíndrica bilateral localizada en el cartílago por debajo de la cavidad nasal. El OVN capta señales químicas sexualmente relevantes y las transduce a información eléctrica para activar en cascada al BOA, el que a su vez activa la porción medial de la amígdala y al NLET (Boehm, 2006). Estas dos últimas estructuras mandan la señal al APM que es la última estructura del circuito o sistema de proyección vomeronasal (Baum y Everitt, 1992b; Swann y cols., 2003), quien integra la información olfatoria sexualmente relevante captada por el órgano vomeronasal para desencadenar los diferentes componentes de la cópula (Agmo, 1999; Paredes, 2003; Swann, 2003).

A principios de la década pasada empleando la técnica de inmunocitoquímica para detectar la proteína fos (producto del gen de expresión temprana *c-fos*) se demostró que el BOA, el NLET, la AME y el APM expresan dicha proteína cuando los animales son expuestos a olores provenientes de una cama de aserrín de hembra receptiva (Baum y Everitt, 1992b), mientras que otros estímulos

olfativos como el olor de manzana, menta ó plátano no producen la activación de dichas estructuras. Estos datos en conjunto con los estudios de neuroanatomía y lesión del BOA, NLET, AME y APM permitieron proponer que estas estructuras forman un circuito que sirve para detectar olores asociados con la receptividad de las hembras (Scalia y Winans, 1975), y a dicho sistema se le ha nombrado sistema de proyección vomeronasal (para revisión ver Boehm, 2006).

El sistema de proyección vomeronasal ha sido estudiado en diversas especies siendo los modelos mas estudiados los ratones, hámsteres y ratas (Beynon y Hurst, 2004).



**Figura 2. Sistemas de proyección vomeronasal y olfatorio principal en roedores.** Todas las estructuras que conforman el sistema de proyección vomeronasal se activan cuando los animales son expuestos a olores de hembras en estro. Todos los componentes del sistema vomeronasal tienen en sus neuronas un gran número de receptores a estrógenos y andrógenos, aunque también se han encontrado en el sistema olfatorio principal. Abreviaturas: BOP= bulbo olfatorio principal; BOA= bulbo olfatorio accesorio; NLET= Núcleo lecho de la estría terminalis; APM = área preóptica medial (Modificado de Baum, 1992a).

A continuación se hace una revisión de la importancia de cada uno de los componentes del sistema de proyección vomeronasal en los roedores haciendo énfasis en como se involucra cada una de las estructuras en la mediación de la conducta sexual masculina.

### *Órgano vomeronasal*

Los olores y las feromonas son sustancias químicas que permiten reconocer objetos en el medio ambiente ó transmitir mensajes a otros organismos de la misma especie respectivamente. Inicialmente se pensó que las feromonas y los olores eran detectados por sistemas neuronales independientes, las feromonas por el órgano vomeronasal mientras que los olores por el epitelio olfatorio, hoy existe controversia sobre esa aseveración (para revisión ver Keverne, 2005; Boehm, 2006), por lo que se considera parcialmente al sistema olfatorio principal.

El OVN lo han dividido en dos regiones, la apical y la basal. Cada una de ellas tiene un tipo de receptores. La región apical tiene receptores de la familia V1 que son de tipo  $G_{12\alpha}$  y la región basal expresan receptores de la familia denominada V2 y son del tipo  $G_{o\alpha}$  (ver revisión Rodriguez, 2004).

La importancia del órgano vomeronasal para el despliegue de la cópula fue evidenciada entre otros por Winans y Power (1977). Estos investigadores empleando al hámster como sujeto experimental demostraron que la deaferentación mediante cortes con navaja del tracto vomeronasal produce la abolición de la expresión de la conducta sexual masculina en el 40 % de los machos. En ese mismo trabajo se reporto que la destrucción de la mucosa olfatoria con sulfato de zinc no impide la ejecución de la conducta sexual. Sin embargo, la lesión del OVN seguida por la lesión de la mucosa olfatoria inhibió la conducta sexual en el 100 % de los hámsteres. Lo que sugirió una coparticipación del órgano vomeronasal y la mucosa olfatoria en el reconocimiento de señales sexualmente relevantes (Winans y Powers, 1977). Por otra parte, la lesión mediante cortes con navaja del tracto olfatorio lateral que conecta al órgano vomeronasal y al bulbo olfatorio accesorio en animales sexualmente expertos inhibe la conducta sexual solamente en el 50 % de los animales lesionados, mientras que lesiones del mismo tipo que incluyen al los tractos olfatorio lateral y olfatorio medial inhiben la cópula en el 100 % de los sujetos (Marques y cols., 1982).

Contrario a lo descrito en el párrafo anterior, se ha demostrado que la extirpación del órgano vomeronasal en animales sexualmente expertos no produce ninguna alteración en el despliegue copulatorio (Meredith y cols., 1980), efecto que fue corroborado posteriormente por el grupo de Kondo (2003). Estos resultados se contraponen a los datos obtenidos por Marques y colaboradores (1982) y por Winans y Powers (1977). Cabe señalar que el procedimiento para lesionar fue distinto, el grupo de Meredith (1980) así como el de Kondo (2003) realizaron extirpación del OVN, mientras que Marquez y colaboradores (1982) y Winans y Powers (1977) realizaron un corte en el tracto olfatorio. Los distintos procedimientos pueden ser el factor que explique las diferencias encontradas.

De manera interesante, se ha demostrado que los efectos de la lesión del órgano vomeronasal dependen de la experiencia sexual. Es decir, si se lesiona a una rata macho sexualmente inexperta se le imposibilita de sus capacidades para ejecutar la cópula, mientras que el mismo tipo de lesión en sujetos con experiencia sexual no interfiere con la conducta sexual. Con esos resultados Meredith (1986) sugirió que se requiere de la integridad del órgano vomeronasal para que un individuo pueda ejecutar su primera experiencia sexual después de la cual el órgano vomeronasal se hace dispensable.

Por último, la lesión del órgano vomeronasal en ratas macho sexualmente expertas interfiere con la capacidad de reconocer a una hembra receptiva pero no afecta la discriminación de olores. Además, cuando los animales lesionados fueron expuestos a olores de hembra sexualmente receptiva no se expresó la proteína fos, lo que demuestra que la activación del circuito de proyección vomeronasal es dependiente del órgano vomeronasal y no de la mucosa olfatoria (Pankevich y cols., 2004). Por otra parte, empleando al ratón como modelo experimental se ha demostrado que la lesión de la mucosa olfatoria con sulfato de zinc en machos sexualmente expertos e inexpertos producen la inhibición total de la cópula (Keller y cols., 2006).

En resumen, la dicotomía funcional del órgano vomeronasal y del sistema olfatorio principal se ha puesto en duda y existen cada vez más evidencias (aunque aún no determinantes) que sugieren la participación de ambas estructuras en el procesamiento de los estímulos olfativos y de las feromonas

(Halpern y Martinez-Marcos, 2003; Johnston, 1998; Keverne, 2005; Marques y cols., 1982; Winans y Powers, 1977; Yoon y cols., 2005). A pesar de todo, la red neuronal mejor conocida como determinante para el control de la conducta sexual sigue siendo las proyecciones del órgano vomeronasal.

### *Bulbo olfatorio accesorio*

El BOA en su porción anterior recibe conexiones eferentes provenientes del OVN que expresa la familia de receptores V1, mientras que la región posterior del BOA recibe las conexiones de la porción basal del OVN, la que expresa receptores de la familia V2. Los axones de las neuronas sensoriales del OVN hacen sinapsis dendrodendríticas con entre 6 y 30 glomérulos del BOA, y a su vez, una célula mitral del BOA puede hacer sinapsis con varios glomerulos (ver revisión Boehm, 2006).

Empleando como sujeto experimental a los ratones se ha observado la activación de la región rostral del BOA cuando se les da a oler aserrín proveniente de una hembra sexualmente receptiva (Matsuoka y cols., 1999). Por otra parte, en la rata la eliminación de las entradas sensoriales al BOA mediante la lesión de OVN produce una disminución del número de neuronas inmunorreactivas a la proteína fos en el BOA cuando los animales son expuestos a olores de una hembra sexualmente receptiva (Meredith, 1998a). Un análisis más detallado ha permitido saber que en la capa granular, pero no en la capa de células mitrales, se activa el gen *c-fos* cuando se expone a un hámster a olores provenientes de una hembra en estro (Kondo y cols., 2003), lo que ha permitido sugerir una participación diferencial entre las dos regiones del BOA en la integración de estímulos activados por feromonas (Matsuoka y cols., 1999). La activación de las neuronas del BOA no parece depender de la experiencia sexual dado que tanto en los animales con experiencia sexual como en los animales sexualmente inexpertos se observó el mismo número de neuronas inmunorreactivas a la proteína fos (Meredith, 1998a).

La lesión del BOA disminuye el número de células inmunorreactivas a la proteína fos en el BOA pero no afecta de manera determinante la conducta sexual (Kondo y cols., 2003). Los efectos fueron únicamente incrementos del número de montas y en la latencia de eyaculación.

Los datos en conjunto demuestran que el BOA, a pesar de ser una de las estructuras que recibe una gran cantidad de aferentes del OVN, no es indispensable para la ejecución de la conducta sexual (Winans y Powers, 1977). El procesamiento de las señales sexualmente relevantes es también controlado por otras estructuras que reciben aferentes del OVN, tales como la amígdala y el NLET, las que como se menciona a continuación, al ser lesionadas se afecta significativamente la ejecución de la conducta sexual.

#### *Amígdala medial*

Empleando la técnica de autorradiografía después de la inyección de aminoácidos tritiados Lehman y Winans (1982) demostraron que el BOA mantiene una conexión anatómica y funcional con la amígdala corticomediale.

La participación de la AME en el control neural de la conducta sexual masculina es aún controversial. Estudios de lesión para evaluar la participación de la AME en el control de la conducta sexual masculina han mostrado que la lesión electrolítica de la amígdala corticomediale elimina todos los componentes de la cópula tanto en animales sexualmente expertos como en animales sin experiencia sexual (Lehman, 1982; Kondo, 1992). Sin embargo, lesiones con radio frecuencia produjo en el 60 % de los sujetos inhibición de la cópula, mientras que el porcentaje restante de animales se observó un incremento en las latencias de monta y eyaculación (de Jonge y cols., 1992).

Mediante la técnica de inmunocitoquímica detectando el gen de expresión temprana c-fos se ha demostrado que el olor de una hembra sexualmente receptiva es suficiente para activar las neuronas de la AME en animales sin experiencia sexual (Hosokawa y Chiba, 2005). El número de neuronas activas en la AME es mayor cuando el animal eyacula una o dos veces respecto de los animales que solamente

montan e intrometen (Baum y Everitt, 1992b; Coolen y cols., 1997a; Coolen y cols., 1996; Coolen y cols., 1997b; Pankevich y cols., 2004; Rizvi y cols., 1998; Rizvi y cols., 1996).

En estudios farmacológicos en donde se inyectó dopamina en la AME se observó una facilitación de la conducta sexual. Por otra parte, en animales anestesiados y en los que se estimuló eléctricamente la AME se ha observado un incremento en la liberación de dopamina en el APM, lo que hace pensar que la amígdala estimula al área preóptica medial empleando dopamina como neurotransmisor durante la cópula (Dominguez y Hull, 2001), más aun, animales que dejaron de copular después de ser lesionados con ácido iboténico en la AME se reestablece el despliegue de la conducta sexual masculina cuando se les inyecta apomorfina en el APM (Dominguez y cols., 2001; Dominguez y Hull, 2001). Esto demuestra la participación del AME en la cópula y su relación con el APM.

#### *Núcleo lecho de la estría terminal*

Otras conexiones del BOA importantes para la cópula son las que mantiene con el NLET (Sequeira, 2000; Scalia y Winans, 1975), otro componente del sistema de proyección vomeronasal (Baum y Everitt, 1992b). De la misma manera, el AME mantiene proyecciones hacia el NLET (véase la figura 2). Las fibras que conectan a la AME con el NLET viajan por la estría terminal (Kevetter y Winans, 1981a; Kevetter y Winans, 1981b).

Detectando la expresión de la proteína fos como indicador de actividad neuronal se ha demostrado que el NLET en el hámster sexualmente inexperto se activa cuando los animales son expuestos únicamente a olores de hembra receptiva, tal como se observa en animales sexualmente expertos (Murphy y cols., 1999). De manera similar sucede en la rata, donde la exposición de olores de hembra receptiva a un macho sexualmente experto produce la activación del NLET (Coolen y cols., 1997b). Dicha activación se observó también cuando se les permitió montar, intrometer o eyacular (Coolen y cols., 1997a; Coolen y cols., 1996). Sin embargo, y a diferencia del hámster, en la rata la

activación del NLET puede estar dependiendo de la experiencia sexual, ya que los machos sexualmente inexpertos que son expuestos a olores de hembra receptiva no tienen activas las neuronas de este núcleo (Hosokawa y Chiba, 2005).

Estudios encaminados a determinar el papel funcional del NLET en la conducta sexual han demostrado que al lesionar esta estructura se afecta la cópula solamente de manera parcial. Lesiones neurotóxicas con ácido quinolínico incrementan el intervalo inter intromisión y la latencia de eyaculación (Liu y cols., 1997), mientras que lesiones electrolíticas del NLET en ratas macho sexualmente expertas incrementaron la latencia de eyaculación debido al incremento del número de montas y de intromisiones pre eyaculatorias (Claro y cols., 1995). En la misma publicación Claro y colaboradores (1995) reportaron un incremento en las latencias de monta, de intromisión y de eyaculación en animales que no tuvieron experiencia sexual previa a la lesión. En este caso los aumentos de las latencias estuvieron asociados a un incremento del intervalo inter intromisión más que al número de intromisiones.

Como se explico en el párrafo anterior la lesión del NLET no altera de manera determinante la expresión de la conducta sexual, sin embargo, en esos mismos animales se ha observado que las erecciones sin contacto se abaten (Liu y cols., 1997). Además reportaron que la lesión del NLET no afecta los acercamientos que el macho realiza sobre la hembra, lo que sugiere que el la ausencia de erecciones sin contacto no son debidas a una disminución en la atención de la hembra (Liu y cols., 1997), sin embargo, el trabajo de Powers y colaboradores (1987) reporta que la lesión del NLET afecta la detección de los olores de hembras en estro. Los datos en conjunto sugieren un mecanismo neuronal diferente en el control de las erecciones in cópula y las sin contacto. Así también sugieren que las erecciones sin contacto abatidas por la lesión del NLET pueden ser debidas a una alteración en el procesamiento de las señales olfatorias (Liu y cols., 1997). Esto ha hecho suponer que el NLET no es solamente un sitio de relevo de la información que va hacia el APM sino que es un sitio importante en funciones integrativas (ver Hull y cols., 2002). El NLET envían axones a la AME y al área preóptica

media, la que es el último componente del sistema de proyección vomeronasal, y de la que se describen diversos aspectos en el siguiente apartado.

### *Área preóptica medial*

El continuo área preóptica medial-hipotálamo anterior o APM es la única estructura que al ser dañada produce la interrupción completa y permanente de la expresión de la cópula independientemente del tipo de lesión que se realice (Paredes y Baum, 1997). La inhibición de la conducta no produce atrofia gonadal o modificaciones en órganos accesorios (Heimer, 1966/1967). Así por ejemplo, lesiones electrolíticas (Edwards y Einhorn, 1986; Edwards y cols., 1996; Heimer, 1966/1967; Meisel y Sachs, 1994; Paredes y cols., 1998), neurotóxicas (Hansen y cols., 1982c; Paredes y Baum, 1995), corte con navaja (Szechtman y cols., 1978), o de cualquier otro tipo y en cualquier especie hasta hoy estudiada producen la inhibición total de la conducta sexual masculina (ver revisión Paredes, 2003).

Diversos grupos de investigación sugieren que el APM juega un papel fundamental en el control de la motivación sexual, por ejemplo, ratas macho a las que se les permitió oler aserrín proveniente de una cama de hembra en estro muestran que las neuronas del APM son inmunorreactivas a la proteína fos. De manera contraria, cuando a los sujetos solamente se les permitió oler aserrín limpio no se notó un incremento en la expresión de la proteína fos en el APM (Baum y Everitt, 1992b; Dominguez-Salazar y cols., 2002; Fewell y Meredith, 2002; Greco y cols., 1998; Paredes y cols., 1998; Portillo y Paredes, 2004; Veening y Coolen, 1998), esto indica que las neuronas del APM solamente se activan cuando el animal percibe olores sexualmente relevantes, además, esto sugiere que cuando los animales perciben las feromonas se activa su sistema de proyección vomeronasal y en la estructura final de dicho sistema, el APM, es en donde se sugiere se da el incremento de su motivación sexual (Agmo, 1999; Kovacs, 1998).

Otras evidencias que apoyan la participación del APM en la motivación sexual son estudios en donde se ha registrado actividad eléctrica de neuronas individuales. Estos registros muestran que en el APM el 67 % de 74 neuronas registradas incrementó su tasa de disparo cuando el animal copuló, mientras que el 16 % se activaron cuando el sujeto experimental husmeó o persiguió a la hembra (Shimura y cols., 1994). En monos se ha asociado la actividad de algunas neuronas del APM con el procesamiento de olores de una hembra a la que puede ver pero con la cual no tiene interacción sexual (Aou y cols., 1984). Por otra parte, se ha demostrado que la estimulación eléctrica del APM en la rata macho produce una exagerada actividad copulatoria, además disminuye algunos parámetros motivacionales (intervalo post eyaculatorio) y algunos de ejecución (el número de intromisiones preeyaculatorias, latencia de intromisión y de la eyaculación), lo que demuestra que el APM participa en la regulación de la motivación sexual (Merari y Ginton, 1975; Paredes y Agmo, 1992). Estudios de lesión han demostrado que el daño del APM reduce el tiempo que el macho pasa con una hembra sexualmente receptiva. Esta preferencia no se reestablece por la administración de testosterona lo que sugiere la pérdida de la motivación por copular (Edwards y Einhorn, 1986).

En contraposición a lo anteriormente expuesto, se ha sugerido que el APM controla los aspectos ejecutorios (monta, intromisión y eyaculación) y no la motivación sexual (Everitt y Stacey, 1987). Esta hipótesis se planteó a partir de que en animales entrenados sobre un esquema de segundo orden a presionar una palanca que les permitía acceder a una hembra sexualmente receptiva. La lesión bilateral del APM no afectó la incidencia del palanqueo, aunque cuando tuvieron a la hembra y pudieron copular con ella no lo hicieron. Una posición diferente tienen Paredes y Baum (1995) quienes demostraron que la lesión del APM en el hurón inhibe la expresión de la cópula, y en una prueba de laberinto en T esos mismos machos pierden la preferencia por una hembra sexualmente receptiva y pasan más tiempo con un macho sexualmente activo después de la lesión. Por otra parte, se ha demostrado que ratas macho con lesión bilateral del APM realizan menos persecuciones sobre la hembra receptiva en pruebas de cópula, lo que sugiere una motivación sexual disminuida (Paredes y cols., 1993a). Con los datos

anteriormente expuestos parece controversial la participación del APM en la motivación y ejecución sexual, sin embargo, Paredes (2003) sugiere que la hipótesis sugerida por Everitt y Stacey (1987) no demuestran contundentemente que el APM no participa en el control de la motivación sexual, dado que el protocolo experimental se siguió pudo condicionarlo a apretar la palanca por la presencia de un conoespecífico (ver revisión Paredes, 2003). Más aún, Paredes (2003) argumentó que si los animales con lesión del APM están motivados como sugirieron Everitt y Stracy (1987) el número de montas se incrementaría después de la lesión, tal como se ha observado en animales que se les afectó la sensibilidad perigenital por la inyección de lidocaina en el prepucio, en los que se produce un incremento en el número de montas y una reducción en el número de intromisiones (Oboh y cols., 1995). Esto no se observa al lesionar el APM, por tal motivo los datos más claros siguen apuntando a que el APM participa en el control de la motivación sexual (Paredes, 2003).

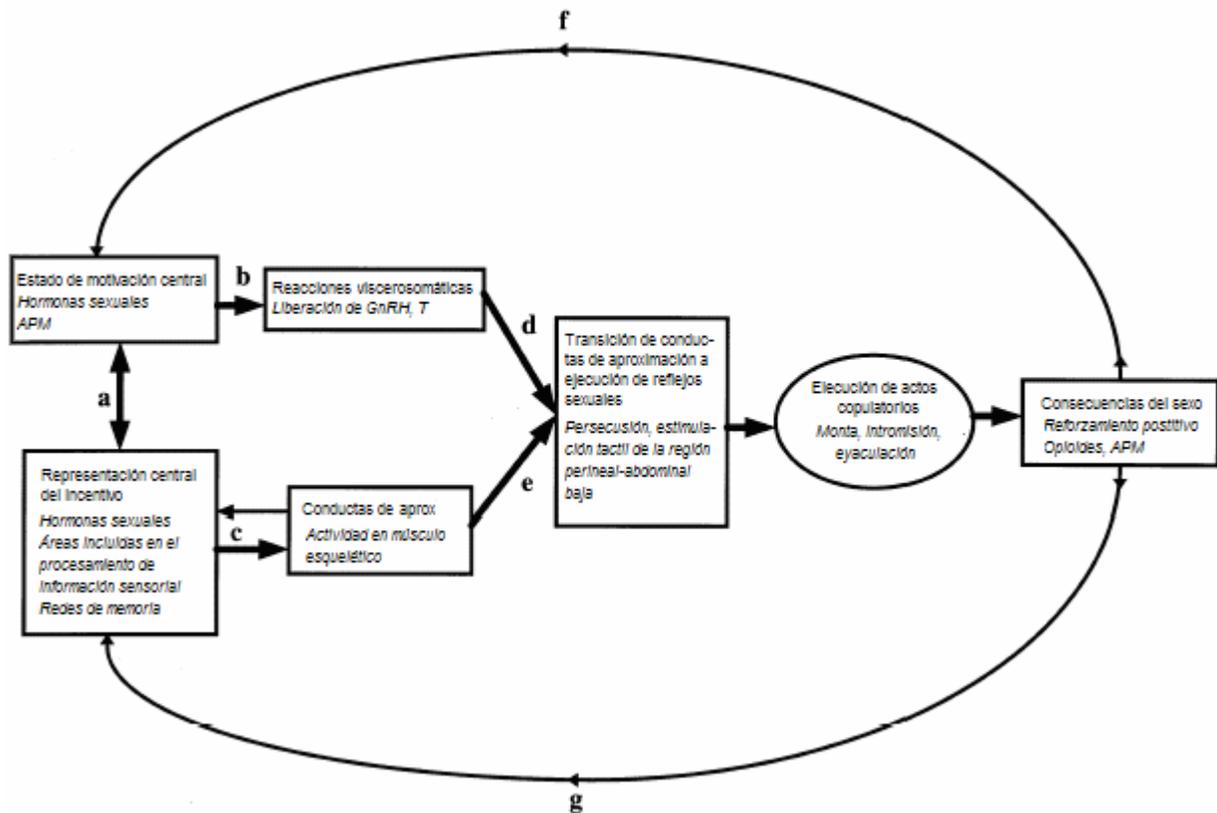
Se ha empleado otro modelo experimental que permite sugerir la participación del APM en la motivación sexual. En ese sentido, utilizando ratas macho que no copularon en varias pruebas de conducta sexual y que fueron catalogados como “no copuladores” cuando se les estimuló eléctricamente (estimulación eléctrica tipo kindling) en el APM ejecutaron la cópula de manera similar a un sujeto copulador (Dominguez-Salazar y cols., 2003; Paredes, 1990a; Portillo y cols., 2003). En los animales copuladores estimulados eléctricamente no se notó ninguna alteración en la expresión de la cópula. Esto sugiere que la estimulación eléctrica tipo kindling facilita la motivación sexual pero no la ejecución de la cópula (Paredes, 1990a).

Otras líneas de investigación sugieren que el APM participa en la motivación sexual. Por ejemplo, farmacológicamente se ha demostrado que el reforzamiento positivo producido por la eyaculación puede afectarse cuando se inyectan drogas en el APM y no en otras estructuras. Agmo y Gomez (Agmo y Gomez, 1993) demostraron que la inyección bilateral de naloxona en el APM pero no en el núcleo acumbens bloquea el efecto reforzante de la eyaculación en pruebas de preferencia de lugar

condicionado, por lo que estos autores asumieron que las neuronas del APM juegan un papel en el control de la motivación sexual.

La cuantificación de niveles de neurotransmisores con la técnica de cromatografía líquida de alta resolución ha permitido determinar que los niveles de dopamina en el APM se incrementan antes de que la rata muestre la primera intromisión, más aún, los niveles de dopamina en animales que mostraron eyaculación fue mayor que en los animales que tuvieron sólo una intromisión. Esto se ha interpretado como incremento en la motivación sexual (Hull y cols., 1999; Mas y cols., 1987; Putnam y cols., 2001).

Sobre la base de diversos estudios Agmo (1999) propuso un modelo para explicar cómo puede generarse la motivación sexual incentiva (Figura 3), donde asume que un grupo de neuronas sensibles a hormonas esteroides y andrógenos (posiblemente en el APM) promueve acciones dirigidas hacia una meta que depende de uno o más estímulos específicos relacionados con un hembra en estro. Con esto sugiere que el núcleo de motivación es sensible únicamente al estímulo sexual. La acción combinada de esos estímulos produce reacciones viscerosomáticas que conducen al macho a aproximarse a la hembra. Finalmente, cuando se establece contacto con la pareja sexual, las conductas de aproximación pueden ser seguidas por la ejecución de los reflejos copulatorios.



**Figura 3. Modelo propuesto para explicar la motivación sexual incentiva.** a) Interacción funcional facilitadora recíproca entre un estado de motivación central y un estímulo sexual. Si se percibe el estímulo sexual el sistema sensorial excita el estado de motivación central, el que a su vez a través de una retroalimentación positiva sensibiliza al sistema sensorial. b) Cuando se alcanza el umbral de excitación en el estado de motivación central, éste activa al sistema visceral preparando al organismo para la interacción sexual. c) Un estímulo ambiental apropiado activa al sistema motor y lleva a interactuar sexualmente al sujeto. Esto puede ser representado centralmente y aumentar el estado de motivación central. e) Cuando las conductas de aproximación han sucedido y se han realizado las reacciones viscerales apropiadas el sujeto inicia la ejecución de reflejos sexuales. Estos reflejos en sujetos sexualmente inexpertos se activan por la estimulación táctil accidental de la región perineal. Si no se tiene estimulación perineal no se pasa de la aproximación a la ejecución de los reflejos copulatorios y el proceso se detiene. f) el estado afectivo positivo que se logra con la eyacuación puede retroalimentar al estado de motivación central y activar un sistema inhibitorio de corta duración, a la vez que, g) los efectos positivos y procesos asociados al reforzamiento pueden potenciar el aprendizaje asociativo. Estos últimos pueden adquirir propiedades incentivas en un futuro dependiendo de la intensidad del efecto positivo que se obtuvo (Tomado de Agmo, 1999).

### *Otras estructuras implicadas en el control de la cópula*

Además del sistema de proyección vomeronasal anteriormente descrito se han estudiado otras estructuras con el fin de conocer el circuito neuroanatómico que puede estar controlando la conducta sexual masculina. A continuación se menciona de manera breve algunas estructuras cerebrales que se han estudiado.

Dada la importancia de la corteza cerebral en el procesamiento de la información que percibe un organismo, ésta fue de las primeras estructuras de las cuales se investigó su participación en la conducta sexual. Franck Beach (1940) reportó trabajos hechos en rata macho, en los que observó que lesiones que incluyeron el 20 % de la corteza cerebral no afectaron la cópula, mientras que lesiones que incluyeron más del 60 % de la corteza sí la eliminaron. Este resultado fue consistente y se repitió independientemente de la localización de la lesión. Estudios más recientes en donde únicamente se ha lesionado la corteza frontal demuestran que la lesión electrolítica de dicha estructura reduce en el 60 % de los machos el despliegue de la cópula de manera permanente. Además, en los animales que eyacularon la lesión incrementó la latencia de monta y de intromisión, mientras que redujo el número de intromisiones pre eyaculatorias (Agmo y cols., 1995).

Otra estructura que también se ha observado que puede estar participando en el control de la cópula es el núcleo acumbens. Lopez y cols. (2002) demostraron que la exposición de olor de una hembra en estro a ratas macho sexualmente expertas activa neuronas en el núcleo acumbens, y de manera contraria, en las ratas macho sexualmente inexpertas que se expusieron al mismo olor no se notaron neuronas activas en el mismo núcleo. Éste hallazgo fue corroborado por Kippin y van der Kooy (2003), quienes sugieren que el incremento de neuronas activas en el núcleo acumbens es debido a una asociación de los olores de la hembra receptiva con la actividad copulatoria. Es decir, la actividad neuronal provocada por los olores de la hembra receptiva en machos sexualmente expertos depende de la experiencia sexual. En ese mismo experimento a un grupo de ratas receptoras se les impregnó aceite de almendra y sirvieron como estímulo sexual de machos sexualmente inexpertos. Los machos

copularon con hembras en las mismas condiciones hasta que fueron sexualmente expertos. Posteriormente, en una prueba de olfacción se empleó como estímulo aceite de almendra y se evaluó la activación neuronal en el núcleo acumbens. Los resultados mostraron una activación de las neuronas del núcleo acumbens. Contrariamente, sujetos que adquirieron la experiencia sexual con hembras que no fueron impregnadas con olor de almendra no hubo activación en el acumbens cuando los sujetos fueron expuestos únicamente al aceite de almendra. Esto sugiere que la activación de neuronas del núcleo acumbens puede generarse por la experiencia sexual.

Diversas estructuras hipotalámicas han sido lesionadas con el fin de saber si participan o no en el control de la cópula, entre ellas el núcleo paraventricular que al ser lesionado únicamente se ve alterado el tamaño del tapón seminal, pero ningún cambio en el despliegue de la cópula (Ackerman y cols., 1997).

Otras estructuras localizadas en el tallo cerebral como el núcleo paragigantocelular parecen tener un papel relevante, dado que la lesión con radio frecuencia de dicha estructura facilita la cópula. Las ratas lesionadas realizaron menos montas e intromisiones antes de eyacular. Se reportó también que el intervalo post eyaculatorio se redujo mientras que el número de eyaculaciones para llegar a la saciedad sexual se incrementó después de la lesión del núcleo paragigantocelular (Yells y cols., 1992).

Por otra parte, el tegmento dorsolateral del mesencéfalo (Brackett y Edwards, 1984; Brackett y cols., 1986; Edwards y Einhorn, 1986; Edwards y Isaacs, 1991; Edwards y Maillard, 1988; Giordano y cols., 1998), y el campo tegmental central (Baum y Everitt, 1992b; Giordano y cols., 2001; Veening y Coolen, 1998), participan también en el control neuronal de la conducta sexual en la rata macho. La participación de dichas estructuras en la cópula son evaluadas en este proyecto y los antecedentes directos se describirán con más detalle en las siguientes páginas.

## 2.4 Participación del tegmento dorsolateral (TDL) en el control de la conducta sexual masculina

El área preóptica medial, como se explicó anteriormente, es la última estructura del circuito de proyección vomeronasal. Sin embargo, las estructuras cerebrales que forman parte del circuito de salida de la información procesada en el APM durante la cópula no se han identificado. Se ha propuesto que las neuronas del APM, a través de sus proyecciones hacia la sustancia gris periacueductal, hacia el núcleo paragigantocelular, al TDL y al CTC pueden estar controlando la conducta sexual masculina.

Conrad y Pfaff (1976) y posteriormente Swanson y colaboradores (1978) empleando la técnica de autorradiografía describieron las conexiones entre el APM y el mesencéfalo. Esos hallazgos han sido ampliamente corroborados a través de la inyección del trazador de vías neuronales leucoaglutinina de *Phaseolus vulgaris* en el APM (Simerly y Swanson, 1988). Por otra parte, la inyección del trazador retrógrado fluorogold en células transplantadas en el tegmento dorsolateral marcó neuronas del APM, lo que sugiere una conexión anatómica entre ambas estructuras (Paredes y cols., 1993b).

El tegmento dorsolateral fue descrito por Brackett y Edwards (1984). Esa descripción hace referencia a que dicha estructura es dorsal a la región medial de la sustancia nigra, e incluye principalmente a los núcleos mesencefálicos profundos. En general, las estructuras mesencefálicas mencionadas anteriormente en conjunto con el resto del mesencéfalo están involucradas con la iniciación de la ejecución motora (Swanson, 2003).

Estudios encaminados a determinar la importancia de las conexiones entre el APM y el TDL en el control de la conducta sexual masculina han mostrado que lesiones electrolíticas bilaterales del TDL inhiben por completo la cópula (Brackett y Edwards, 1984; Giordano y cols., 1998), de la misma manera que las lesiones electrolíticas del APM (Heimer y Larsson, 1966/1967). Sin embargo, el trabajo que al parecer dejó más convencidos a los investigadores sobre las conexiones estructurales y funcionales entre el APM y el TDL fue realizado por Brackett y colaboradores (1984). En él se describió que la lesión electrolítica unilateral del APM seguida de la lesión electrolítica contralateral del

TDL inhibe por completo la expresión de la conducta sexual en la rata macho. De esa fecha en adelante se dio por hecho que la información procesada en el APM tiene como núcleo de salida al TDL.

La abolición de la cópula en animales lesionados electrolíticamente en el TDL se ha atribuido a la reducción de la motivación en la conducta sexual (Edwards y Einhorn, 1986). Sin embargo, estos mismos autores ponen de manifiesto que la motivación sexual no fue completamente reducida. Esto lo argumentaron con pruebas de preferencia en donde los machos podían interactuar con una hembra receptiva y una no receptiva. En esos experimentos notaron que los animales lesionados prefirieron siempre a la hembra receptiva. Datos contrarios fueron reportados por Giordano y colaboradores (1998), quienes demostraron que conductas asociadas a la motivación sexual como son la persecución y la exploración de los genitales de una hembra sexualmente receptiva con la que puede copular se reducen completamente después de la lesión del TDL.

El primer experimento del presente trabajo fue hecho para tratar de determinar si las lesiones neurotóxicas del TDL que solamente destruyen cuerpos celulares y no axones afectan la motivación sexual o el despliegue de la conducta sexual en la rata macho.

## 2.5 Participación del campo tegmental central (CTC) en el control de la conducta sexual masculina

El campo tegmental central se ubica en el tálamo posterior (Coolen y cols., 1996; Greco y cols., 1998). Se ha demostrado una interconexión entre el CTC y el APM con técnicas de autorradiografía (Conrad y Pfaff, 1976; Swanson y cols., 1978) o inyectando trazadores neuronales (Coolen y cols., 1998; Simerly y Swanson, 1988).

Existen diversas evidencias que sugieren la participación del CTC en el despliegue de la conducta sexual masculina. Una de las primeras evidencias fue reportada por Baum y Everitt (1992), quienes demostraron que el CTC expresa la proteína fos, la que es producto del gen de activación temprana *c-fos*, si y sólo si el sujeto experimental ejecuta intromisiones, siendo este incremento mayor en los

sujetos que eyaculan. Este hallazgo fue corroborado por otros grupos de investigación (Coolen y cols., 1996; Greco y cols., 1998). La relación funcional entre el CTC y el APM parece estar bien determinada. En este sentido, se ha sugerido que el CTC funciona como estructura de relevo de la información sensorial generada en los genitales. Al lesionar el CTC con ácido quinolínico se reduce la expresión de fos en el APM, aunque para ver este efecto es necesario producir ipsilateralmente una lesión de la amígdala medial. Esto sugiere que el CTC provee al APM información sensorial perigenital y la amígdala medial provee información olfatoria (Baum y Everitt, 1992b).

Datos obtenidos en nuestro laboratorio han demostrado que la inactivación temporal del CTC, mediante la inyección de lidocaína, disminuye considerablemente el porcentaje de sujetos que ejecutan la cópula. Los datos muestran que la lidocaina inyectada en el CTC inhibió en el 80 % de los sujetos el despliegue de montas e intromisiones, mientras que en el 100 % de los animales no se observó el patrón de eyaculación en pruebas que duraron 30 min (Hurtazo, comunicación personal).

Una subdivisión anatómica del CTC que incluye una pequeña columna horizontal de neuronas dorsal al lemnisco medial conocida como núcleo talámico subparafascicular parvocelular (SPFp) parece ser importante en el control de la eyaculación a nivel central (Veening y Coolen, 1998). El SPFp se extiende lateral al fascículo retroflexus, dorsal al lemnisco medial, mientras que en su porción más caudal está localizado lateral al lemnisco medio y extendido sobre el núcleo peripeduncular (Coolen y cols., 1996; Coolen y cols., 2003a). Se ha sugerido que el SPFp se activa únicamente cuando los animales copulan pero no cuando sólo se les pone olores de una hembra sexualmente receptiva (Coolen y cols., 1997b), lo que también sugiere que el núcleo en cuestión participa en la sensibilidad genital.

Una de las características del núcleo SPFp es que expresa receptores a galanina y a la proteína relacionada al gen de calcitonina (CGRP). Las neuronas galaninérgicas ocupan la parte medial del SPFp mientras que las neuronas CGRPérgicas son localizadas en la porción lateral (Coolen y cols., 2003a). También de manera diferencial se ha localizado la expresión de fos en el SPFp. Se ha

observado que en la parte medial del núcleo se expresa fos únicamente cuando se pone a copular a los animales.

Resulta interesante el hecho de que lesiones neurotóxicas en la médula espinal en los núcleos IX y X (neuronas galaninérgicas) y que envían aferentes al SPFp inhiben el reflejo eyaculatorio, sin afectar la expresión de las montas o intromisiones. Esto llevó a sugerir que la porción del SPFp que recibe aferentes de neuronas localizadas en los segmentos lumbares están controlando la eyaculación pero no los aspectos generales sensoriales a nivel genital (Coolen, 2005; Truitt y Coolen, 2002).

A pesar de que los antecedentes previos sugieren una participación del CTC en el control de la conducta sexual masculina, no se ha diseñado ningún experimento para determinar de qué manera participa el CTC en el control de la cópula, por lo que en este trabajo exploramos los efectos que produce la lesión neurotóxica bilateral del CTC en la conducta sexual en la rata macho.

### III. Planteamiento del problema

Para la identificación de redes neuronales que controlan una conducta determinante en la sobrevivencia de las especies como lo es la conducta sexual se han utilizado diferentes metodologías, entre las cuales podemos mencionar la inyección de trazadores neuronales, la detección de la actividad neuronal a través de la proteína fos producto del gen de activación temprana *c-fos*, el registro electrofisiológico *in vivo*, la inyección de drogas agonistas y antagonistas de los diferentes sistemas de neurotransmisión, la inactivación temporal del núcleo estudiado mediante la inyección de lidocaina, las lesiones neurotóxicas, las lesiones por radiofrecuencia y las lesiones electrolíticas. De los tipos de lesión conocidos la neurotóxica parece ser la mejor alternativa dado que daña únicamente a los cuerpos neuronales dejando intactos a los axones que pasan por las estructuras lesionadas. Se han lesionado diversas áreas del cerebro para determinar si controlan la cópula. El APM es la única estructura que al ser lesionada con cualquier procedimiento produce la pérdida total del apareamiento en todas las especies hasta hoy estudiadas (Paredes y Baum, 1997). Varias líneas de investigación sugieren que las lesiones del APM inhiben la cópula por alteraciones en la motivación sexual por una hembra receptiva (Paredes y Baum, 1997; Paredes, 2003), por otra parte, se ha propuesto que las neuronas del APM mediante las proyecciones hacia el TDL y al CTC están controlando la conducta sexual. Existen relativamente pocos estudios que han tratado de determinar si la lesión de cada una de esas estructuras participa en el control de la cópula. Se ha reportado que la lesión electrolítica del TDL produce un abatimiento total de las conductas coitales en la rata macho (Brackett y Edwards, 1984; Giordano y cols., 1998). No se sabe si la extinción de la cópula generada por la lesión electrolítica del TDL se produce por alterar aspectos motivacionales y/o motores relacionados con la conducta sexual. En el caso del CTC, únicamente se ha sugerido que controla la conducta sexual porque se activa fos después de que los animales copulan y porque la lesión unilateral del CTC afecta la expresión de fos en el APM ipsilateral (Baum y Everitt, 1992b; Coolen y cols., 1996).

En este trabajo tratamos de discernir si la lesión de los cuerpos neuronales en el TDL (experimento 1) o del CTC (experimento 2) altera el despliegue de la conducta sexual masculina. En cada experimento además de evaluar la cópula también analizamos el despliegue de las conductas sociosexuales, preferencia de pareja y ejecución motora con el fin de determinar, en caso de encontrar alteraciones, si la inhibición de la cópula se produce por alteraciones en la motivación sexual o si existe algún daño motor que impida a los animales desplegar la conducta sexual.

## **IV. Hipótesis generales**

1. La lesión neurotóxica del TDL inhiben la expresión de la conducta sexual masculina.
2. La lesión neurotóxica del CTC inhiben la expresión de la conducta sexual masculina.

## **V. Objetivos generales**

1. Evaluar si la lesión neurotóxica bilateral del TDL inhibe la conducta sexual masculina.
2. Determinar los efectos de la lesión bilateral del CTC sobre la conducta sexual masculina.

## **VI. Métodos generales**

### **1. Sujetos**

Utilizamos ratas macho de la cepa Wistar ( $300\pm 50$  gr.) que fueron mantenidas en un bioterio con ciclo de 12 hrs luz- 12 hrs oscuridad (la luz se encendió a las 22:00 hrs) con acceso libre a agua y alimento para roedores (Lab Diet Feed PMI, USA. No. 5008). Para los experimentos se usaron únicamente sujetos que eyacularon con hembras receptoras en tres pruebas consecutivas pero separadas por 4 días entre ellas. Como estímulo sexual se utilizaron hembras ovariectomizadas de la misma cepa tratadas con  $25 \mu\text{g/rata}$  de benzoato de estradiol (48 h) y  $1 \text{ mg/rata}$  de progesterona (4 h) antes de la prueba (Sigma Chemical Company St. Louis, MO, USA). Las hormonas se administraron por vía subcutánea utilizando como vehículo aceite vegetal en un volumen de  $0.2 \text{ ml/rata}$ . Este tratamiento indujo un alto índice de receptividad en las hembras.

### **2. Cirugía**

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico i.p ( $35 \text{ mg/kg}$ ) y colocados en un aparato estereotáxico. No empleamos mezcla de ketamina-xilacina para anestesiarse porque la ketamina protege a las neuronas de los efectos tóxicos del ácido quinolínico. Se produjo una lesión neurotóxica inyectando ácido quinolínico ( $0.12\text{M}$  in PBS; pH 7.4), un agonista de receptores NMDA. El neurotóxico se preparó el mismo día que se administró y antes de ser inyectado se mantuvo en refrigeración. Para intentar lesionar bajamos una jeringa Hamilton de  $1 \mu\text{l}$  sobre el TDL o el CTC e inyectamos a presión  $0.75 \mu\text{l}$  de ácido quinolínico por lado. Toda la infusión del neurotóxico fue realizada en 7 min y la jeringa fue dejada en el sitio de lesión por 5 minutos adicionales. El procedimiento para lesionar la región contralateral fue el mismo. Después de la lesión se dejaron transcurrir 8 días antes de la evaluación conductual. El esquema de observación conductual post lesión fue el mismo que se siguió en la fase pre lesión.

### **3. Conducta sexual**

Los animales fueron probados con hembras receptoras en una caja de observación (40 x 60 x 40 cm) que tuvo una cama de aserrín Beta-chip. Después de colocar a los sujetos se registraron los siguientes parámetros: latencias a la primera monta, intromisión y eyaculación, así como la duración del intervalo posteyaculatorio. Se registró también el número de montas y de intromisiones realizadas en una serie eyaculatoria. La prueba duró hasta que el macho hizo una intromisión después de la primera eyaculación, o si el animal no eyaculó la prueba finalizó después de una hora.

### **4. Conducta sociosexual**

Se registraron los siguientes parámetros: erguido (cuando el animal se levanta sobre sus patas posteriores), husmeo (movimientos rápidos de la cabeza y de las vibras mientras el animal explora), auto aseo (lamido o mordisqueo de sus miembros o región genital), aseo de pareja (lamido o mordisqueo de la pareja), exploración genital (husmeo o mordisqueo de los genitales de la hembra), persecución (el macho corretea a la hembra para tener contacto con ella), y descanso. Estas variables fueron registradas empleando el programa "The observer, versión 2 para Windows (Noldus)" durante los primeros 10 minutos de la prueba de conducta sexual. La conducta sociosexual únicamente se evaluó en la tercera sesión pre y post lesión.

### **5. Preferencia de pareja**

Se empleó una caja de 90 cm de largo x 30 de ancho, la cual está dividida en 3 compartimentos de 30 cm por lado. El compartimento central está comunicado con dos compartimentos laterales a través de una ventana deslizante (10 X 10 cm). Para la prueba se colocó en un compartimento lateral un macho estímulo sexualmente activo mientras que en el compartimento del lado opuesto se colocó una hembra sexualmente receptiva. Los sujetos estímulo fueron mantenidos en sus respectivos

compartimentos con chalecos colocados sobre sus espaldas atadas a un resorte colocado en cada compartimento. De esta manera los animales estímulo se pueden mover libremente y desplegar conducta sexual pero no pueden salir de su compartimento. Se determinó la preferencia de los sujetos experimentales cuantificando el tiempo que permanecían en los compartimentos de los sujetos estímulo en pruebas de 10 min. Se realizaron dos pruebas pre lesión y dos pruebas post lesión. Se dejó pasar como mínimo ocho días entre cada prueba. El índice de preferencia se calculó dividiendo el tiempo total que estuvo en el compartimento de la hembra receptiva entre el tiempo que permaneció con la hembra mas el tiempo con el macho. Un índice de preferencia de 0.5 indica que no existe preferencia, un índice de preferencia mayor indica preferencia por una hembra sexualmente receptiva y un índice menor a 0.5 indica preferencia por el macho.

## **6. Ejecución motora**

Estudios previos han mostrado una correlación significativa entre las alteraciones en la ejecución motora y alteraciones en la conducta sexual masculina. Esto es, si un tratamiento farmacológico inhibe la ejecución motora evaluada en el rota rod la conducta sexual se inhibe (Agmo y cols., 1987). Para descartar posibles efectos de la lesión sobre funciones motoras que pueden afectar de manera indirecta la conducta sexual evaluamos la ejecución motora de la rata en la prueba de rota rod (Accuscan Electronics, Columbus, OH mod. 7548). Este aparato consiste de un cilindro (3.5 pulgadas de diámetro) que gira a diferentes velocidades. Antes de la prueba los sujetos fueron entrenados al rota rod girando a 30-rpm durante 180 seg una vez en la mañana y otra vez en la tarde por 4 días consecutivos. Durante la prueba los sujetos fueron puestos sobre el cilindro rotando a 35-rpm. Se cuantificó el número de caídas durante un periodo de 180 seg.

## **7. Inmunocitoquímica**

Al final del experimento los animales fueron anestesiados con una sobredosis de pentobarbital sódico i.p. y por vía intracardiaca se les prefundió con 200 ml de solución salina (al 0.9 %) seguido de 200 ml de paraformaldehído al 4 % preparado en PBS .1M. Posteriormente extrajimos los cerebros y los colocamos en paraformaldehído por 1 hr. Finalmente se les colocó en sacarosa diluida al 30 % en agua desionizada para crioprotección.

El cerebro fue cortado en rebanadas coronales de 30  $\mu$ m con un microtomo de congelación a nivel del TDL o del CTC. Se hizo una recolección de tres series de rebanadas alternadas. Una serie fue teñida con violeta de cresilo, para tener un orden de las secuencias histológicas. La segunda serie fue utilizada para realizar una inmunocitoquímica para la detección de la proteína glial ácido fibrilar (GFAP) utilizando como anticuerpo anti-GFAP, y la que está localizada solamente en la células gliales astrocíticas, células que se incrementan en número si se produce alguna lesión neurotóxica (Bjorklund y cols., 1986). Finalmente, la tercera serie de rebanadas se empleó para realizar inmunocitoquímica contra la proteína neuronal (Neu-N) localizada principalmente en el núcleo. De esa manera evaluamos el número de neuronas e indirectamente determinamos la proporción de muerte neuronal, tal como lo realizaron previamente Truitt y Coolen (2002).

El protocolo para realizar la inmunocitoquímica para GFAP fue el mismo llevado a cabo por Bjorklund y colaboradores (Bjorklund y cols., 1986), mientras que el realizado para Neu-N fue el mismo empleado por (Mullen y cols., 1992). De manera resumida los procedimientos se llevaron a cabo de la siguiente manera: empleamos el método de flotación libre en donde lavamos las rebanadas de cerebro en buffer de fosfatos (PBS, pH 7.4) 3 veces. Las rebanadas fueron secuencialmente pretratadas con borohidrato de sodio al 0.5% en PBS por 15 min, Triton X-100 al 1% en PBS con 1% peróxido de hidrógeno por 30 min, dimetil sulfoxido en PBS por 10 min, y 20 % de suero de cabra con 0.3 % de Tx en PBS por 15 min. Incubamos el tejido en el anticuerpo monoclonal anti-GFAP (Santa Cruz Biotechnology; 1:1,000) por 16 h a temperatura ambiente. Después de la incubación las rebanadas

fueron lavadas con PBS conteniendo 0.01 % de Tx e incubadas por 2 h en anticuerpo secundario IgG biotinilado anti ratón y hecho en cabra (Vector Laboratories). Para la inmunocitoquímica contra Neu-N el tejido fue incubado por 14 h a temperatura ambiente en anticuerpo monoclonal biotinilado Anti-Neu-N (Chemicon; 1:10,000). Después de lavar las rebanadas se les incubo en el reactivo ABC por 2 h. La inmunocitoquímica para GFAP fue visualizada con DAB mientras que Neu-N con níquel DAB.

## **8. Análisis estadístico**

Comparamos el porcentaje de machos que realizaron montas, intromisiones y eyaculaciones con una  $\chi^2$  seguida por la prueba de probabilidad exacta de Fisher. El número de montas, intromisiones, latencia de eyaculación y la duración del intervalo post eyaculatorio fue analizado con una ANOVA de dos vías para medidas repetidas (4 grupos x 4 sesiones en el experimento 1 y de 3 grupos x 4 sesiones en el experimento 2) y como prueba *post hoc* empleamos la prueba Fisher LSD. Los datos de latencia de monta y de intromisión fueron analizados con una prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba U de Mann-Whitney debido a que no tuvieron una distribución normal. La ejecución motora, la preferencia de pareja, las conductas sociosexuales y la motivación sexual incentiva fueron evaluadas con un ANOVA de dos vías (grupo x sesión) para medidas repetidas en el factor sesión seguida de la prueba Fisher LSD para comparaciones múltiples. Consideramos una  $p < 0.05$  como estadísticamente significativa.

## **VII. Experimento 1**

### **1. Hipótesis particular**

La lesión neurotóxica del tegmento dorsolateral afecta la conducta sexual masculina por alteraciones en la ejecución motora.

### **2. Objetivos particulares**

Determinar si el tegmento dorsolateral esta involucrado en la motivación sexual masculina.

Evaluar si la lesión del tegmento dorsolareral afecta la ejecución motora.

### **3. Métodos específicos**

#### 3.1 Sitio de la lesión

Se intentó realizar una lesión neurotóxica en 25 sujetos experimentales. A otros 10 sujetos se les inyectó solución vehículo. Las coordenadas usadas para lesionar el TDL fueron tomadas teniendo como referencia estudios previos (Giordano y cols., 1998) y fueron: -5.5 posterior a bregma; 2.0 mm lateral de la línea media; y -6.5 ventral con respecto a la dura madre de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (1986).

#### 3.2 Histología

Con un microscopio Olympus B X 60 que tiene adaptada una cámara digital Hitachi conectada a un sistema de análisis de imágenes computarizado (Image-pro, Media Cybernetics, Silver Spring, MD) observamos rebanadas coronales. Localizamos la región correspondiente al TDL y capturamos imágenes empleando un objetivo 2X.

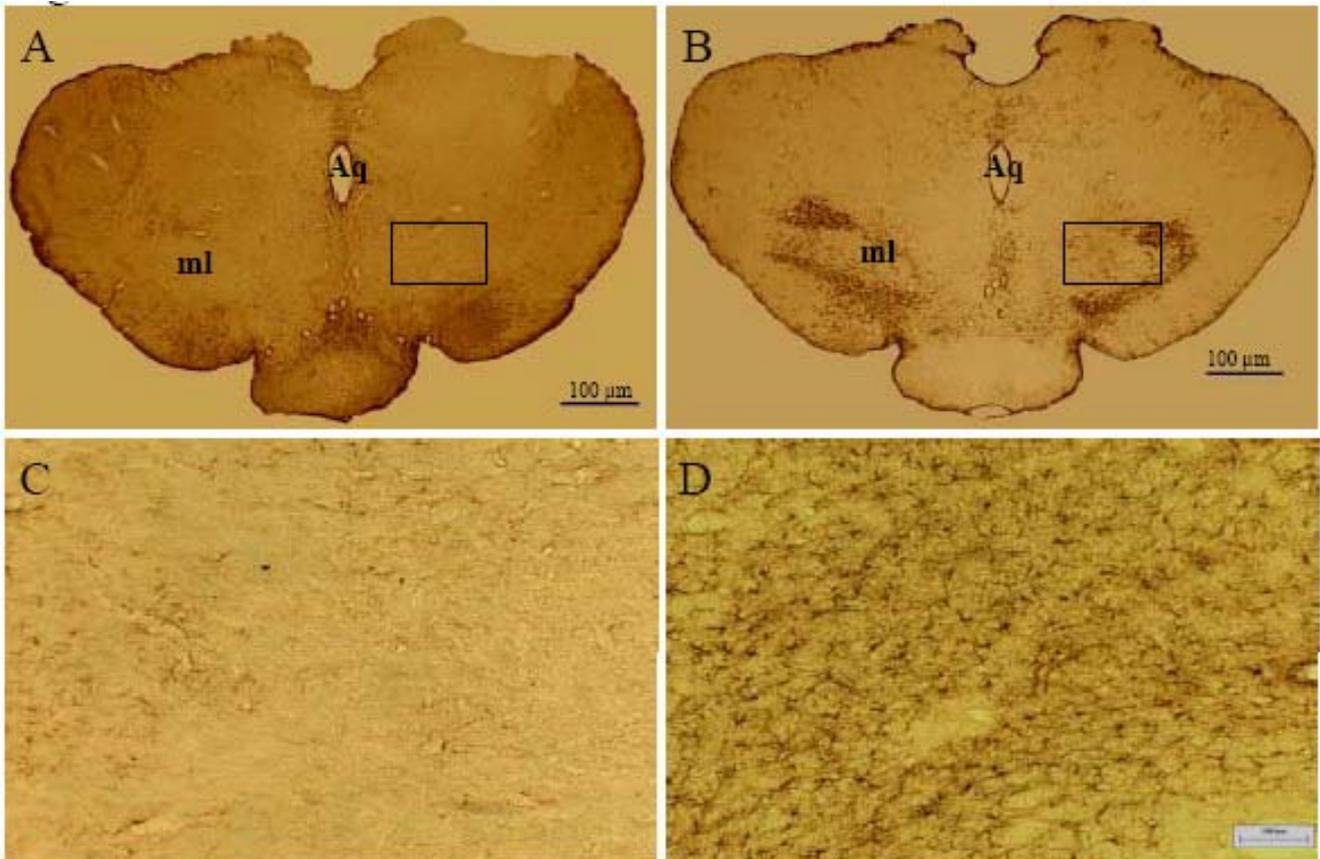
Determinamos que una rata inyectada con ácido quinolínico en el TDL tuvo lesión cuando observamos un incremento de células gliales en mayor proporción respecto a una inyectada con solución salina (Figura 4). También evaluamos el número de neuronas en el TDL y en los animales en los que se observó un incremento de GFAP notamos regularmente un menor número de neuronas marcadas con Neu-n (Figura 5). Para determinar la proporción de la lesión en las imágenes capturadas trazamos un círculo de 650  $\mu\text{m}$  de radio dorsal a la sustancia negra y comparamos el tejido proveniente de un sujeto inyectado con el neurotóxico contra uno inyectado con solución vehículo. Consideramos que hubo lesión cuando la inmunorreactividad a GFAP fue visualmente mayor de la mostrada por los sujetos control y cuando el número de neuronas detectadas con la inmunorreactividad a Neu-N fue al menos 40 % menor con respecto al grupo control. El número de neuronas fue cuantificado con el software image-pro para Windows.

La determinación de la lesión con GFAP y la cuantificación del número de neuronas en el TDL se realizó en 4 rebanadas de cerebro correspondientes a las placas 37, 38, 39 y 41 del atlas de Paxinos y Watson (1986).

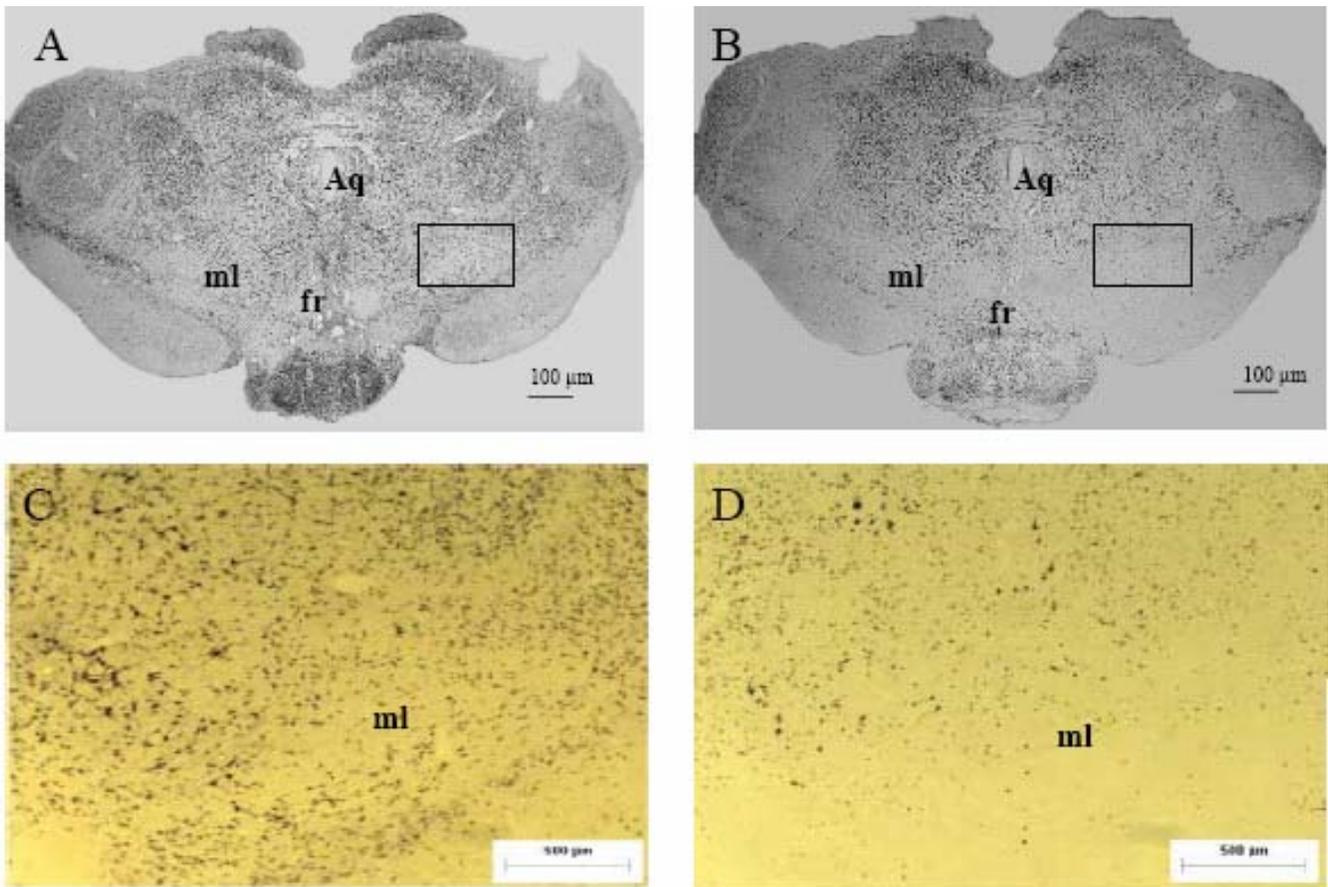
#### **4. Resultados histológicos**

Desconociendo los datos conductuales de cada sujeto procedimos a la evaluación de la lesión para ubicarlos en los diferentes grupos antes de analizar sus datos conductuales. Al final del análisis determinamos que únicamente 10 sujetos tuvieron lesión bilateral, ya que en ellos observamos inmunorreactividad a GFAP y un número menor de neuronas en el TDL. El área lesionada incluyó de manera regular a la zona incerta y a los núcleos del campo de Forel en el borde rostral, mientras que en la parte posterior de la lesión se incluyó a los núcleos mesencefálicos profundos y parcialmente al núcleo rojo.

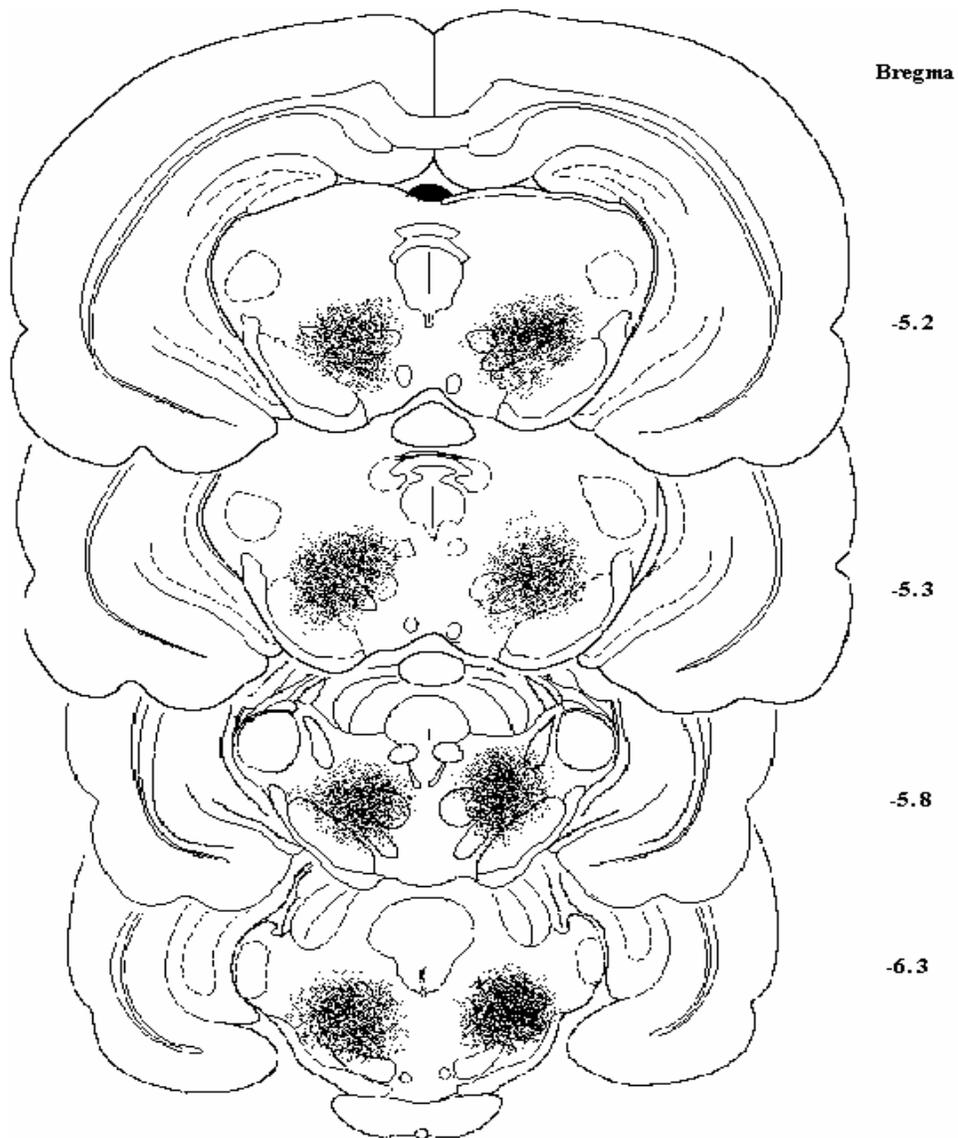
Un esquema que representa el área lesionada en estos animales se muestra en la figura 6. El porcentaje de neuronas cuantificado en este grupo osciló entre el 40 % y el 60 % menos que en los sujetos control (Tabla 1). En un subgrupo de 8 animales observamos inmunorreactividad a GFAP y un menor número de neuronas en la parte correspondiente al TDL únicamente en un lado del cerebro por lo que se les agrupo como animales con lesión unilateral o parcial. Otro subgrupo de 7 sujetos que denominamos con lesión fuera del área de interés fue conformado por 4 animales que tuvieron la lesión fuera del TDL y por 3 animales que fueron inyectados con ácido quinolínico pero que no se detectó en ellos inmunorreactividad a GFAP ni un decremento del número de neuronas.



**Figura 4. Fotomicrografías de cortes coronales del cerebro de un animal inyectado con solución vehiculo (A y C) y uno inyectado con ácido quinolínico y catalogado como lesionado bilateralmente del TDL (B y D).** La fotografía del panel C es un acercamiento del corte mostrado en A mientras que D es un acercamiento del B. La comparación de los cortes completos permite notar la lesión del TDL en B por manchas de color más oscuro en el tejido. La ampliación de B mostrada en D confirma la lesión por presencia de astrocitos inmunoreactivos a GFAP en el TDL. Abreviaturas: aq= acueducto cerebral; lm=lemnisco medial.



**Figura 5.** Fotografías que muestran la inmunorreactividad a Neu-N en tejido de un animal inyectado con solución vehiculo (A y C) y uno con lesión bilateral del TDL por la inyección de ácido quinolínico (B y D). La fotografía del panel C es un acercamiento del corte mostrado en A mientras que D es un acercamiento del B. Los cuadros en A y B muestran la región en donde se llevó a cabo las inyecciones, aunque los cuadros están unilateralmente en cada corte la inyección fue bilateral. La ampliación de A mostrada en C y su comparación con la ampliación de B mostrada en D permiten notar en el animal lesionado menos neuronas (D). Abreviaturas: aq= acueducto cerebral; lm=lemnisco medial.



**Figura 6. Representación esquemática del área común lesionada en animales inyectados en el TDL con ácido quinolínico.** El esquema fue elaborado sobrelapando en orden descendente las figuras 37-39 y 41 de atlas del cerebro de rata de Paxinos y Watson (1986). Los números de la derecha corresponden a la distancia en milímetros con respecto a Bregma.

**Tabla 1. Número de neuronas detectadas con inmunocitoquímica para núcleos neuronales (Neu-N) en sujetos a los que se les inyectó vehículo, sujetos con lesión bilateral, parcial ó en los que la inyección del neurotóxico quedó fuera del TDL (media±EE).**

<b>Nivel respecto a Bregma</b>	<b>Lado</b>	<b><i>Vehículo</i> (10)</b>	<b><i>Bilateral</i> (10)</b>	<b><i>Parcial</i> (8)</b>	<b><i>Fuera</i> (7)</b>
<b>-5.2</b>	Izq	884	441	963	627
	Der	1180	523	874	609
<b>-5.3</b>	Izq	859	447	771	517
	Der	1032	437	828	594
<b>-5.8</b>	Izq	801	470	967	958
	Der	756	309	1016	675
<b>-6.3</b>	Izq	763	401	900	667
	Der	757	326	937	655

Se indica el nivel en el cual las neuronas fueron contadas en ambos lados. Entre paréntesis de indica el número de sujetos.

## **5. Resultados conductuales**

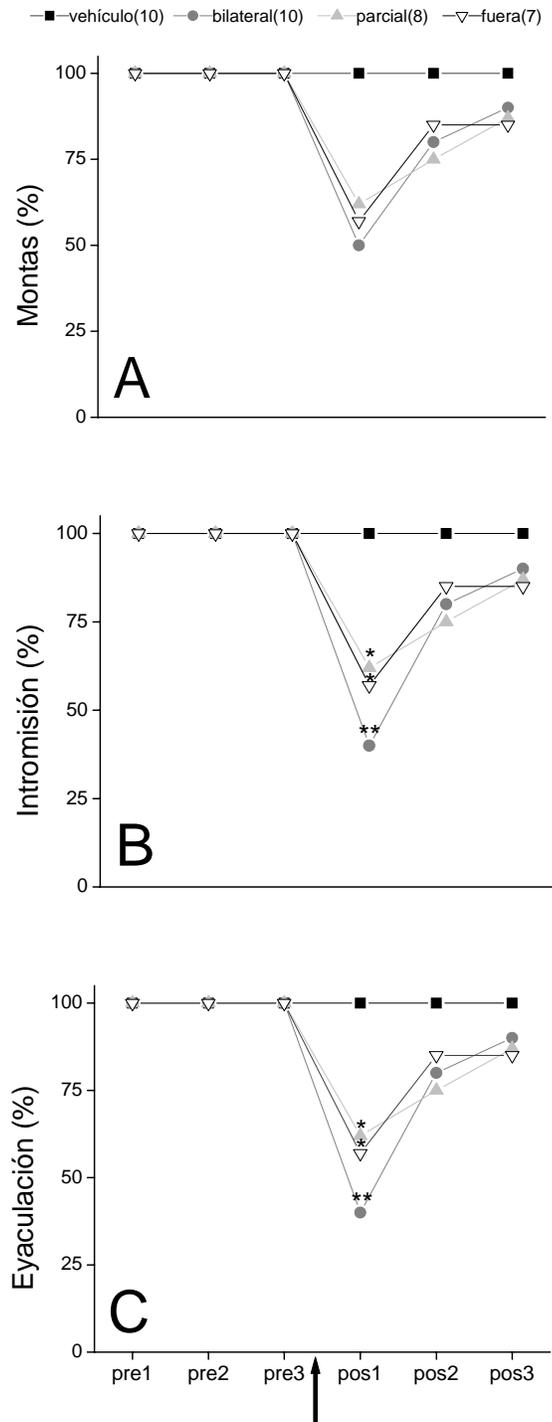
### **5.1 Porcentajes de monta, intromisión y eyaculación**

El porcentaje de machos que montaron, intrometieron y eyacularon se muestra en la figura 7. Se puede observar en el panel A una disminución en el porcentaje de sujetos que montaron después de que se practicó la lesión neurotóxica. El grupo inyectado con solución vehículo no se vio afectado y si vimos un decremento en el porcentaje de machos que montaron en los grupos inyectados con ácido quinolínico. El grupo en el que se notaron los mayores efectos fue en el grupo con lesión bilateral del

TDL, en donde el 50 % de los animales no mostró ninguna monta durante la primera sesión post lesión, mientras que en el grupo con lesión parcial el 38 % y en el grupo con lesión fuera el 43 % de machos no montó (Figura 7A). A pesar de que hubo una disminución del porcentaje de machos que montó en la primera sesión post lesión en los sujetos con lesión respecto de los controles no hubo diferencias estadísticas significativas entre los grupos [ $X^2(3)=6.74$ ;  $p=0.08$ ]. En las sesiones 2 y 3 post lesión el porcentaje de machos que montaron osciló entre el 75% y 90 % en todos los grupos lesionados, mientras que el 100 % de los machos control mostraron respuestas de monta.

En lo que se refiere al patrón motor de intromisión notamos que el 60 % de los animales no lo mostró en la primera sesión post lesión. En esa misma sesión el 40 % de los animales con lesión fuera no intrometieron mientras que en el grupo con lesión parcial el 45 % no intrometió (Figura 7B). Todo esto representó diferencias estadísticas significativas entre grupos [ $X^2(3)=8.41$ ;  $p=0.03$ ], pero el mayor efecto se observó en el grupo lesionado en el TDL [ $p<0.01$ ], mientras que en los grupos con lesión parcial y fuera también hubo un efecto respecto al grupo control [ $p<0.05$ ]. El porcentaje de sujetos que realizaron intromisiones en la segunda y tercera sesión post lesión fue similar al grupo control.

Los porcentajes de sujetos que eyacularon en la primera sesión se redujo en un 60 % en el grupo con lesión bilateral, aunque notamos también decrementos en los grupos parcial y fuera (Figura 7C; [ $p=0.03$ ]), siendo afectado en mayor proporción el grupo lesionado en el TDL [ $p<0.01$ ], y en menor proporción los grupos con lesión parcial y fuera [probabilidad exacta de Fisher's  $p<0.05$ ]. El porcentaje de sujetos que eyaculó en la segunda y tercera sesión post lesión fue similar al del grupo control (Figura 7C).



**Figura 7. Porcentaje de ratas que desplegaron monta (A), intromisión (B) o eyaculación (C) antes y después de ser lesionados con ácido quinolínico.** Es evidente la disminución del porcentaje de machos que mostraron monta, intromisión o eyaculación en la primera sesión post lesión y su recuperación en la segunda y tercera prueba post lesión. La flecha indica el momento de la lesión. El número de sujetos que conforman cada grupo se indica en paréntesis. \* diferente del grupo control  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

## 5.2 Número y latencia de monta e intromisión

Se compararon los valores obtenidos en la tercera prueba pre lesión y en las 3 pruebas post lesión. Los datos analizados corresponden a datos obtenidos de sujetos que desplegaron la cópula. No hubo diferencias estadísticamente significativas en la comparación entre grupos [ $F(3;34)=0.46$ ;  $p=0.71$ ]. De manera similar, no hubo cambios en el número de intromisiones [ $F(3;34)=0.57$ ;  $p=0.63$ ], véase la tabla 2. El número de intromisiones se redujo de manera significativa con el incremento de las sesiones [ $F(3,105)=8.91$ ;  $p<0.001$ ]. Este efecto se observó en los grupos control, bilateral y parcial (Tabla 2). Las latencias de monta [ $F(3;34)=0.66$ ;  $p=0.58$ ] e intromisión no se modificaron [ $F(3;34)=0.65$ ;  $p=0.58$ ] en ningún caso. Ni la latencia de eyaculación [ $F(3;34)=1.04$ ;  $p=0.38$ ] ni la duración del intervalo post eyaculatorio [ $F(3;34)=2.38$ ;  $p=0.9$ ] se afectaron por la lesión.

**Tabla 2. Frecuencias y latencias de monta e intromisión en grupos lesionados en el TDL.**

Variable	Tratamiento	Pre lesión	Post lesión		
		3	1	2	3
NM	Vehículo	9.9±2.1	11.8±3.0	14.9±5.5	7.3±1.7*
	Bilateral	12.6±2.5	8.4±4.0	7.7±2.2	6.4±1.5
	Parcial	10.1±4.1	13.2±6.5	5.6±1.9*	7.7±2.5
	Fuera	13.1±4.9	17.0±8.1	7.3±2.4	9.8±3.2
NI	Vehículo	19.4±2.8	13.8±1.8*	12.4±1.0*	12.4±1.2*
	Bilateral	19.2.0±3.0	12.5±1.8	12.5±2.2*	10.1±1.5**
	Parcial	16.5±2.6	16.2±6.5	8.8±0.4*	12.8±2.7
	Fuera	17.8±2.6	18.2±4.0	11.5±0.9	16.3±5.4
LM	Vehículo	68±35	179±136	77±27	81±40
	Bilateral	36±12	234±119	46±13	267±149
	Parcial	58±34	59±34	155±139	70±25
	Fuera	112±98	67±25	52±20	31±15
LI	Vehículo	139±100	207±137	115±34	197±127
	Bilateral	42±14	147±27	331±206	369±168
	Parcial	60±33	142±115	172±136	160±112
	Fuera	118±100	93±34	95±39	59±30
LE	Vehículo	732±99	589±90	559±79	444±54
	Bilateral	616±114	589±29	410±80	312±58
	Parcial	447±81	516±47	345±78	390±96
	Fuera	613±190	784±393	321±98	394±175
IPE	Vehículo	527±127	562±143	401±71	357±28*
	Bilateral	362±11	347±17	371±69	342±42
	Parcial	336±17	343±42	280±19	296±19
	Fuera	366±23	343±18	314±24	319±24

Los valores son la media ± error estándar. Abreviaturas: NM=Número de montas; NI= Número de intromisiones; LM=Latencia de monta; LI=Latencia de intromisión; LE=Latencia de eyaculación; IPE=Intervalo posteyaculatorio. \* Diferente de la tercera sesión antes de la lesión p<0.05; \*\* p<0.01.

### 5.3 Conducta sociosexual en sujetos lesionados en el TDL

Se encontró un incremento en la frecuencia de exploraciones genitales [F(3,90)=12.1; p<0.001]

en los grupos bilateral y parcial respecto del control (Tabla 3). La frecuencia de husmeo se incrementó en todos los grupos con lesión respecto del control [F(3,90)=9.62; p<0.01], mientras que los aseos a la pareja se incrementaron únicamente en los grupos con lesión bilateral y fuera [F(3,90)=8.46; p<0.01]. Las conductas sociosexuales de persecuciones, autoaseos y erguidos no se afectaron.

En las tres conductas sociosexuales se notó un incremento en la frecuencia (Tabla 3). Ese aumento representó diferencias estadísticas respecto a la sesión prelesión en las tres conductas sociosexuales.

**Tabla 3. Frecuencia de conductas sociosexuales en animales lesionados en el TDL**

Variable	Observación	Tratamiento			
		Vehiculo (10)	Bilateral (10)	Parcial (8)	Fuera (7)
Persecución	Pre lesión	31±4	28±2	27±4	25±2
	Post lesión	23±2	22±3	29±3	27±5
Exploración Genital	Pre lesión	2.7±1.1	1.5±0.6	3.5±1.2	2.5±1.5
	Post lesión	5.4±1.7	11.9±4.5**	11.0±4.4*	5.7±1.8
Aseos de pareja	Pre lesión	1.6±0.6	3.2±0.7	4.1±1.3	2.1±1.2
	Post lesión	2.0±0.8	7.6±2.3*	7.1±1.9	6.5±2.5*
Auto aseos	Pre lesión	31±2	27±2	30±3	30±3
	Post lesión	27±1	23±3	28±2	26±4
Husmeos	Pre lesión	24±2	18±2	17±6	18±2
	Post lesión	18±2*	35±7**	28±6**	33±5**
Erguidos	Pre lesión	9±2	11±3	11±5	6±3
	Post lesión	7±2	16±5	9±4	10±3

Los datos son la media ± error estándar. \* Diferente de los valores pre lesión en el mismo grupo p<0.05; \*\* p<0.01. Entre paréntesis se muestra el número de sujetos.

Con respecto a la duración de las conductas sociosexuales no se detectaron alteraciones producidas por la lesión (Tabla 4).

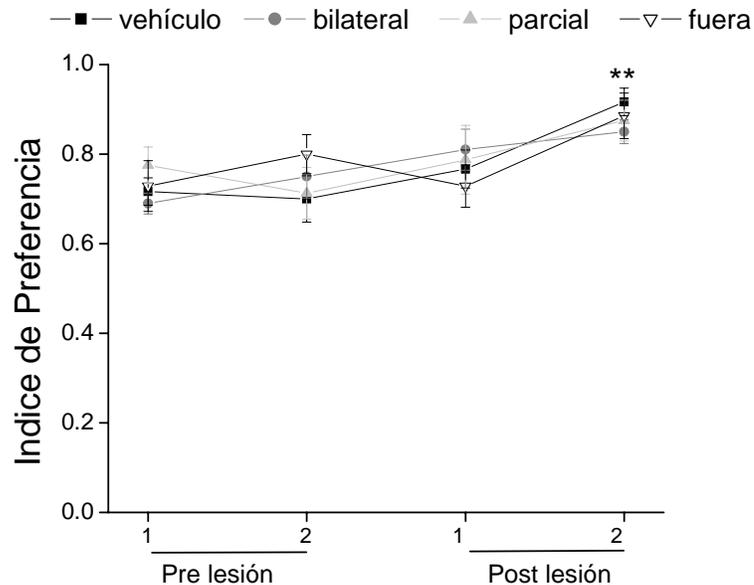
**Tabla 4. Duración de conductas socio sexuales en animales lesionados en el TDL**

Variable	Observación	Tratamiento			
		Vehiculo (10)	Bilateral (10)	Parcial (8)	Fuera (7)
Persecución	Pre lesión	113±11	83±6	95±24	140±36
	Post lesión	78±16	57±10	71±12	76±19
Exploración genital	Pre lesión	17±6	15±7	25±12	14±7
	Post lesión	11±5	37±14	15±6	15±6
Aseos de pareja	Pre lesión	3.0±0.8	6.1±1.5	11.6±4.4	8.1±6.3
	Post lesión	2.7±1.2	17.5±7.1	9.8±2.8	11.0±4.8
Auto aseos	Pre lesión	212±19	199±12	191±21	201±24
	Post lesión	212±20	143±33	189±26	151±24
Husmeos	Pre lesión	106±26	73±22	54±23	41±16
	Post lesión	105±22	161±28	103±18	158±58
Erguidos	Pre lesión	17±6	15±8	7±3	6±3
	Post lesión	22±8	38±16	31±13	12±4

Entre paréntesis se muestra el número de sujetos. Los datos son la media ± error estándar.

#### 5.4 Preferencia de pareja

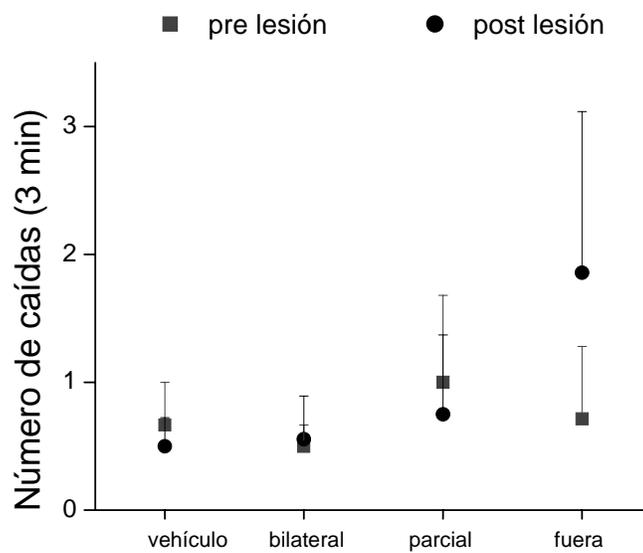
En la figura 8 se muestra el índice de preferencia de pareja calculado para cada uno de los diferentes grupos. Puede notarse en cada sesión y en todos los grupos que el valor del índice de preferencia es mayor a 0.5, lo que demuestra que siempre hay una preferencia por una hembra receptiva. En la comparación entre grupos no se encontró ningún efecto [F (3,31)=0.06; p=0.97; grupos por prueba F (9,93)=1.54; p=0.14]. En la ultima sesión post lesión se notó un incremento respecto a la primera sesión de cada grupo, siendo estadísticamente diferente [F (3,139)=17.65; p=0.01].



**Figura 8. Índice de preferencia** (media  $\pm$  EEM) en sujetos con lesión neurotóxica del tegmento dorsolateral. Los valores por arriba de 0.5 indican preferencia por la hembra receptiva. \*\* Diferente de la segunda sesión pre lesión  $p < 0.01$ .

### 5.5 Coordinación motora en sujetos lesionados en el tegmento dorsolateral

En el grupo control la frecuencia de caídas fue de alrededor de 1 antes y después de la lesión. Esa misma frecuencia fue observada en los grupos con lesión bilateral y con lesión parcial, mientras que en el grupo con lesión fuera se observó un incremento a un promedio de 2 caídas. Sin embargo la variabilidad en ese grupo denotada por el error estándar fue muy grande (Figura 9). No se encontró ningún efecto estadísticamente significativo [grupos  $F(3;31)=0.61$   $p=0.61$ ; prueba  $F(1,69)=0.50$ ,  $p=0.48$ ; grupo por prueba  $F(3,31)=0.66$ ;  $p=0.57$ ]. Cabe mencionar que en el grupo con lesión fuera en dos sujetos se observó lesión amplia de la sustancia negra, dichas ratas tuvieron daños severos en la ejecución motriz al tener muchas caídas durante la prueba.



**Figura 9. Número de caídas (media  $\pm$  EEM) registradas en animales lesionados en el TDL. Sólo el grupo con lesión fuera tendió a tener en promedio más caídas que el resto de los grupos después de la lesión.**

## 6. Discusión

Los resultados del presente estudio indican que la lesión bilateral del TDL por la inyección de ácido quinolínico reduce en más del 50 % el número de núcleos neuronales afectando de manera transitoria el despliegue de la conducta sexual masculina. La lesión en todos los grupos inhibió en la primera sesión post lesión el porcentaje de machos que intrometieron y eyacularon. En las sesiones restantes no se encontró ninguna diferencia entre los animales lesionados y los inyectados con solución vehículo. Las latencias y frecuencias de monta e intromisión, así como la latencia de eyaculación y la duración del intervalo post eyaculatorio no se vieron alteradas por la lesión en ninguno de los grupos. Por otra parte, las conductas sociosexuales de exploración genital, de aseo de pareja y de husmeo se incrementaron en todos los grupos con lesión. Finalmente, la preferencia de pareja y la coordinación motora tampoco se vieron afectadas por la lesión.

En el grupo con lesión bilateral del TDL la inmunocitoquímica para GFAP mostró que la lesión por la inyección del neurotóxico afectó principalmente a los núcleos mesencefálicos profundos, aunque en algunas ratas alcanzó parte de las estructuras adyacentes como la sustancia negra y el núcleo rojo. Por otra parte, la cuantificación de los núcleos neuronales detectados con inmunocitoquímica para NeuN reveló que la lesión redujo el número de neuronas en el TDL entre un 50 % y 70 % sin que se inhibiera permanente la expresión de la conducta sexual, ya que todos los machos eyacularon en al menos una de las tres sesiones post lesión. Resultará interesante entonces evaluar si una lesión en donde se elimine el 100 % de las neuronas inhibe permanente la cópula.

Inicialmente en el proyecto se planteó la hipótesis de que la lesión del TDL inhibiría la expresión de la conducta sexual, sin embargo los animales volvieron a copular en la tercera sesión post lesión. Esta recuperación se puede explicar si consideramos que las neuronas que sobreviven a la inyección del ácido quinolínico pueden ser capaces de retomar la función de las neuronas lesionadas. Al respecto, existen evidencias de que el mesencéfalo es un sistema plástico y que es capaz de generar nuevas conexiones (Vuillon-Cacciuttolo y cols., 1986). Así, se ha demostrado que el núcleo rojo modifica sus

conexiones cuando se produce una lesión en el tracto corticospinal favoreciendo el reestablecimiento del control de la locomoción (Belhaj-Saif y Cheney, 2000; Fanardjian y cols., 2000). Se ha demostrado que la lesión del tracto corticospinal incrementa la actividad eléctrica del núcleo rojo en más de un 50 % (Belhaj-Saif y Cheney, 2000). Esos hallazgos se asociaron con la recuperación de la locomoción producida por la lesión, ya que a los 20 días de haberse producido la lesión los animales recuperaron sus capacidades motrices al 100 %. Los autores adjudicaron sus resultados a una probable reconexión neuronal. Aunque también se ha demostrado que la lesión del cerebelo produce un incremento de la descarboxilasa de ácido glutámico en el núcleo rojo, el sistema enzimático que sintetiza GABA, lo que sugiere las neuronas compensan mediante un mecanismo plástico la lesión del cerebelo (Vuillon-Cacciuttolo y cols., 1986). Desafortunadamente en este experimento no podemos determinar si la inhibición de la cópula dos semanas post lesión fue debida a una alteración en las capacidades motrices de los animales, dado que la conducta motora se evaluó alrededor de 20 días después de la lesión. Probablemente periodo suficiente para que los animales recuperen sus capacidades motrices, tal como sucede cuando se lesiona el núcleo rojo (Fanardjian y cols., 2000). Por tal motivo es crucial un experimento en donde se realice una lesión del 100 % de las neuronas del TDL y una evaluación de la ejecución motora inmediatamente después de la lesión, con el objetivo de saber si existe una correlación entre la inhibición de la conducta sexual masculina observada en las primeras dos semanas post lesión y la ejecución motora.

Estos estudios muestran que la lesión de más del 50 % de las neuronas del TDL no afecta permanentemente la cópula, por lo que es necesario hacer una lesión del 100 % de las neuronas para saber si se produce una inhibición permanente de la conducta sexual, lo que implicaría que las neuronas del TDL son esenciales para el control de la cópula. Por otra parte, si la lesión del 100 % de las neuronas reproduce los datos observados en este experimento, se ratificará la importancia de los axones que cruzan al TDL, los que como se explicó en la introducción provienen del APM. Esa sugerencia es factible ya que las lesiones electrolíticas contralaterales que destruyen neuronas y axones del TDL y del

APM inhibieron de manera permanente el despliegue de la cópula (Brackett y Edwards, 1984; Edwards y Einhorn, 1986; Giordano y cols., 1998), de la misma manera que la lesión bilateral del TDL (Brackett y Edwards, 1984; Edwards y Einhorn, 1986; Giordano y cols., 1998), lo que explicaría porqué la conducta sexual no fue afectada de manera permanente por las lesiones neurotóxicas. Nuestros resultados concuerdan con observaciones previas en donde se lesionó la zona incerta, un lugar anatómicamente cercano al tegmento dorsolateral que fue incluido en algunas de esas lesiones, y cuyos efectos no alteraron el despliegue de la conducta sexual (Maillard y Edwards, 1991). Todos estos datos en conjunto sugieren que son los axones y no las neuronas del TDL los esenciales en el despliegue de la cópula.

El tegmento dorsolateral en conjunto con el resto de las estructuras mesencefálicas están controlando la iniciación de los patrones motores (Swanson, 2003), por tal motivo la hipótesis planteada fue en el sentido de que la lesión del tegmento dorsolateral produciría la inhibición de la cópula por una alteración en el control motor, sin embargo, como se dijo previamente, en el periodo en el que se evaluó la ejecución motora (20 días post lesión) no se observó ningún efecto. Y aunque en este experimento no se encontraron alteraciones motoras no se descarta la posibilidad de que en las primeras semanas post lesión no existan daños motores.

Otro aspecto a discutir es el área de lesión producida. En cuanto a éste tema vale la pena destacar que las coordenadas empleadas en los trabajos de Brackett y Edwards (1984), Edwards y Einhorn (1986) y de Giordano y colaboradores (1998) como en el presente fueron las mismas. En este estudio, la extensión de la lesión abarcó a los núcleos mesencefálicos profundos, a la porción dorsal del núcleo rojo y en algunas ocasiones a una pequeña porción dorsal de la sustancia nigra. Dichas estructuras también fueron afectadas cuando se intentó lesionar electrolíticamente el TDL en un trabajo previo hecho en el laboratorio (Giordano y cols., 1998). Un hecho importante del presente trabajo es que no se dañaron los axones de paso con la inyección de ácido quinolínico, tal como Bjorklund y colaboradores

(1986) demostraron, que la inyección de ácido quinolínico produce muerte neuronal sin afectar la viabilidad de los axones.

Como se mencionó en la introducción, el APM da origen a los axones que hacen sinapsis o que cruzan el TDL (Conrad y Pfaff, 1976; Swanson y cols., 1978). La destrucción electrolítica del TDL inhibe la expresión de la conducta sexual masculina (Brackett y Edwards, 1984; Giordano y cols., 1998). Por otra parte, la lesión electrolítica unilateral del APM combinado con la lesión electrolítica contralateral del TDL produce alteraciones permanentes en la conducta sexual masculina (Brackett y Edwards, 1984). De manera interesante, el déficit conductual producido por la lesión electrolítica del TDL es revertido por implantes de tejido hipotalámico fetal en la zona lesionada (Giordano y cols., 2001), tal y como sucedió en animales lesionados electrolíticamente del APM, en los cuales se revirtió el efecto de la lesión con trasplantes del mismo tipo (Paredes y cols., 1990b). Más aún, la inyección del trazador retrógrado fluorogold en el TDL tiñe células hipotalámicas transplantadas en el APM de los animales lesionados, lo que sugiere un establecimiento de conexiones entre las células transplantadas y el TDL fundamentales para recuperar la conducta sexual (Paredes y cols., 1993b). Después de lo anteriormente expuesto es evidente que se requiere un estudio entre las reconexiones del APM y estructuras posteriores al TDL que puedan estar involucradas en la cópula.

Por otra parte, la prueba de preferencia de pareja permite determinar alteraciones en la motivación sexual (Paredes y cols., 1998b), al igual que las conductas sociosexuales de persecución de la hembra y exploración de los genitales de la hembra durante la cópula (Agmo, 1999). Los datos observados en estas pruebas muestran que no hubo alteraciones en la preferencia de pareja ni en las conductas sociosexuales asociadas a la motivación sexual, sugiriendo que no hubo una reducción en la motivación sexual. Sin embargo, habrán de ser evaluados dichos parámetros justo después de la lesión, para saber si la inhibición de la cópula observada en la primera sesión post lesión se da por una reducción de la motivación sexual o por una alteración de las capacidades motrices del animal.

En resumen, las lesiones neurotóxicas del TDL producen una alteración transitoria de la conducta sexual sugiriendo que las neuronas de esta región no son indispensables para el control de la conducta sexual masculina. Este trabajo es el primero en aportar datos contundentes sobre el porcentaje de muerte neuronal producida por la inyección de ácido quinolínico en el TDL y su efecto sobre la conducta sexual masculina.

## **VIII. Experimento 2**

### **1. Hipótesis particular**

La lesión neurotóxica del campo tegmental central afecta la conducta sexual masculina incrementando la aparición del patrón de monta e inhibiendo el patrón de eyaculación.

### **2. Objetivos particulares**

Determinar si el campo tegmental central esta involucrado en la motivación sexual masculina.

Evaluar si la lesión del campo tegmental central afecta la ejecución motora.

### 3. Métodos específicos

Los sujetos se mantuvieron en las condiciones descritas en el método general y las pruebas de conducta sexual, conducta sociosexual, preferencia de pareja y ejecución motora se realizaron como se indica en el mismo apartado.

#### 3.1 Motivación sexual incentiva

El procedimiento que se siguió fue el estandarizado por Agmo y cols (2003). En términos generales el aparato consta de una caja negra (100 x 50 x 45 cm) con dos compartimentos abiertos (25 x 25 cm) diagonalmente opuestos en sus paredes largas. Dos cajas (25 x 25 x 15 cm) en las cuales se colocó una hembra sexualmente receptiva o un macho sexualmente activo fueron puestas por fuera de las arenas, una sobre cada agujero. El frente de las cajas de los incentivos tiene una malla de alambre (1-mm), que permite a los sujetos experimentales ver, oler y oír a los sujetos estímulo, pero no tocarse. En la parte contigua de las cajas de los sujetos incentivos y por dentro de la arena se trazó una arena virtual (30 x 20) que denominamos zona incentiva. La prueba experimental inicio cuando se colocó al sujeto experimental en la parte central de la arena de prueba. En la prueba que duro 10 min cuantificamos el tiempo que permaneció el sujeto experimental en cada una de las zonas incentivas y la distancia recorrida durante la prueba, para lo cual utilizamos un sistema de video (Ethovision Pro, Noldus, Wageningen, The Netherlands). Antes de la prueba se habituó a los animales a la arena de motivación incentiva durante tres sesiones de 10 min cada una y con 24 hrs de separación entre ellas. En el periodo de entrenamiento las cajas laterales no tuvieron sujetos estímulo.

#### 3.2 Sitio de lesión

Para este experimento se emplearon 30 animales. A un grupo de 10 sujetos se les inyectó solución vehículo y en 20 sujetos se intentó hacer una lesión neurotóxica bilateral en el CTC. Las

coordenadas usadas para lesionar el CTC fueron tomadas teniendo como referencia estudios previos (Baum y Everitt, 1992b) y fueron: -5.0 posterior partiendo de bregma; 2.7 mm lateral a la línea media; y -6.0 ventral con respecto a la dura madre y de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (1986). El procedimiento seguido para la inyección del neurotóxico se especifica en la sección correspondiente a los métodos generales (pag 36). Después de la lesión se dejó transcurrir 8 días antes de la evaluación conductual. Se repitió el mismo esquema de observación conductual seguido en la fase pre lesión.

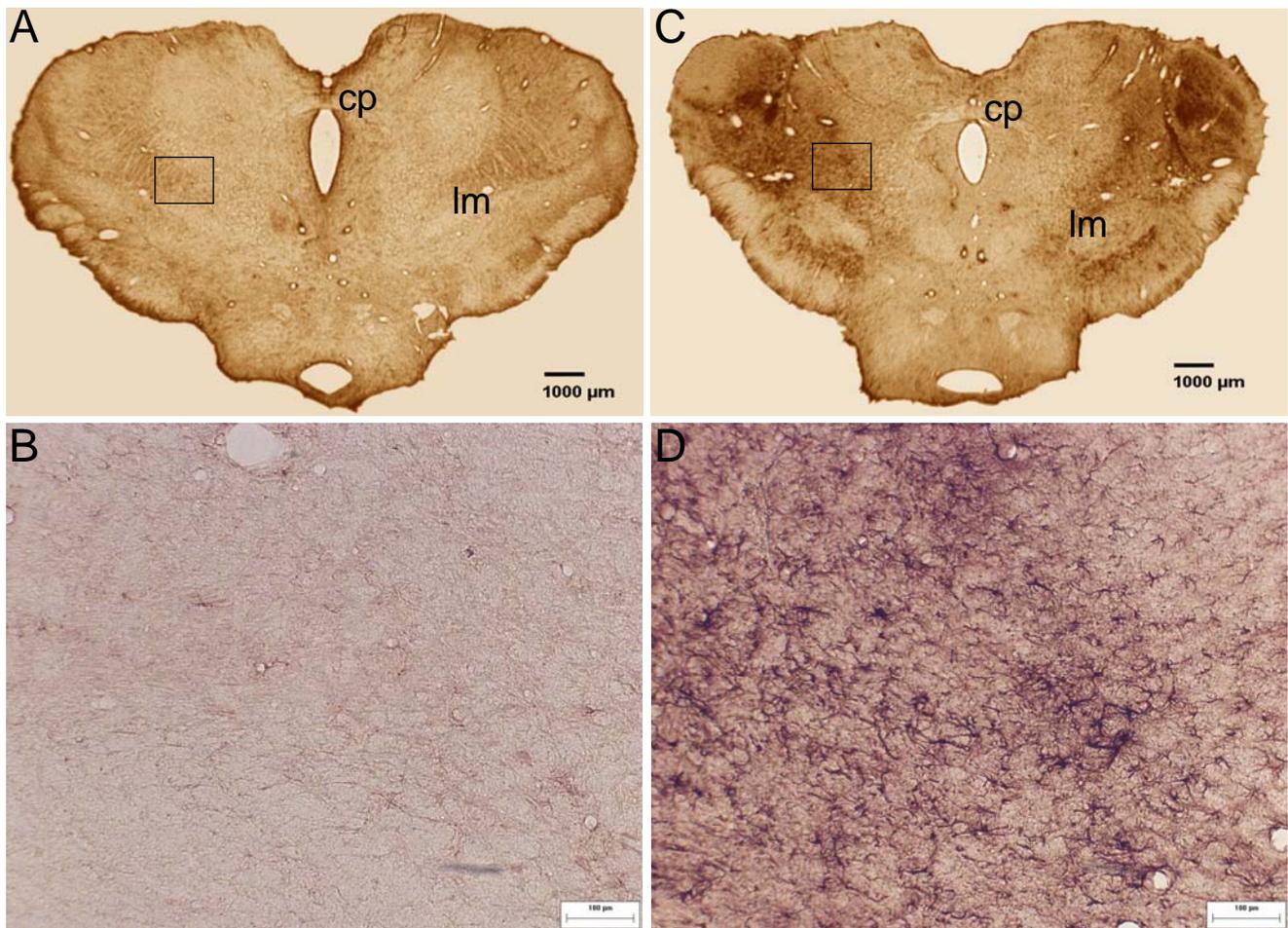
### 3.3 Histología

Para el análisis empleamos el mismo equipo descrito en el experimento 1 en la sección correspondiente a histología. Capturamos imágenes del CTC con un objetivo 4X. Dibujamos un cuadro sobre el CTC (1400 x 700) justo por encima del lemnisco medial con el fin de determinar si la inyección de ácido quinolínico produjo un incremento de las células gliales o para cuantificar el número de neuronas sobre dicha área. Consideramos que los animales tuvieron lesión bilateral del CTC cuando la inmunoreactividad de GFAP fue abundante en comparación con los sujetos inyectados con solución vehículo (Figura 10). El número de núcleos neuronales detectados con la inmunocitoquímica para Neu-N (Figura 11) fue cuantificado empleando el software “Image Pro” para Windows. Seleccionamos para su evaluación 4 rebanadas de cerebro de cada sujeto que correspondieron a las figuras 36-39 del atlas de Paxinos y Watson (1986).

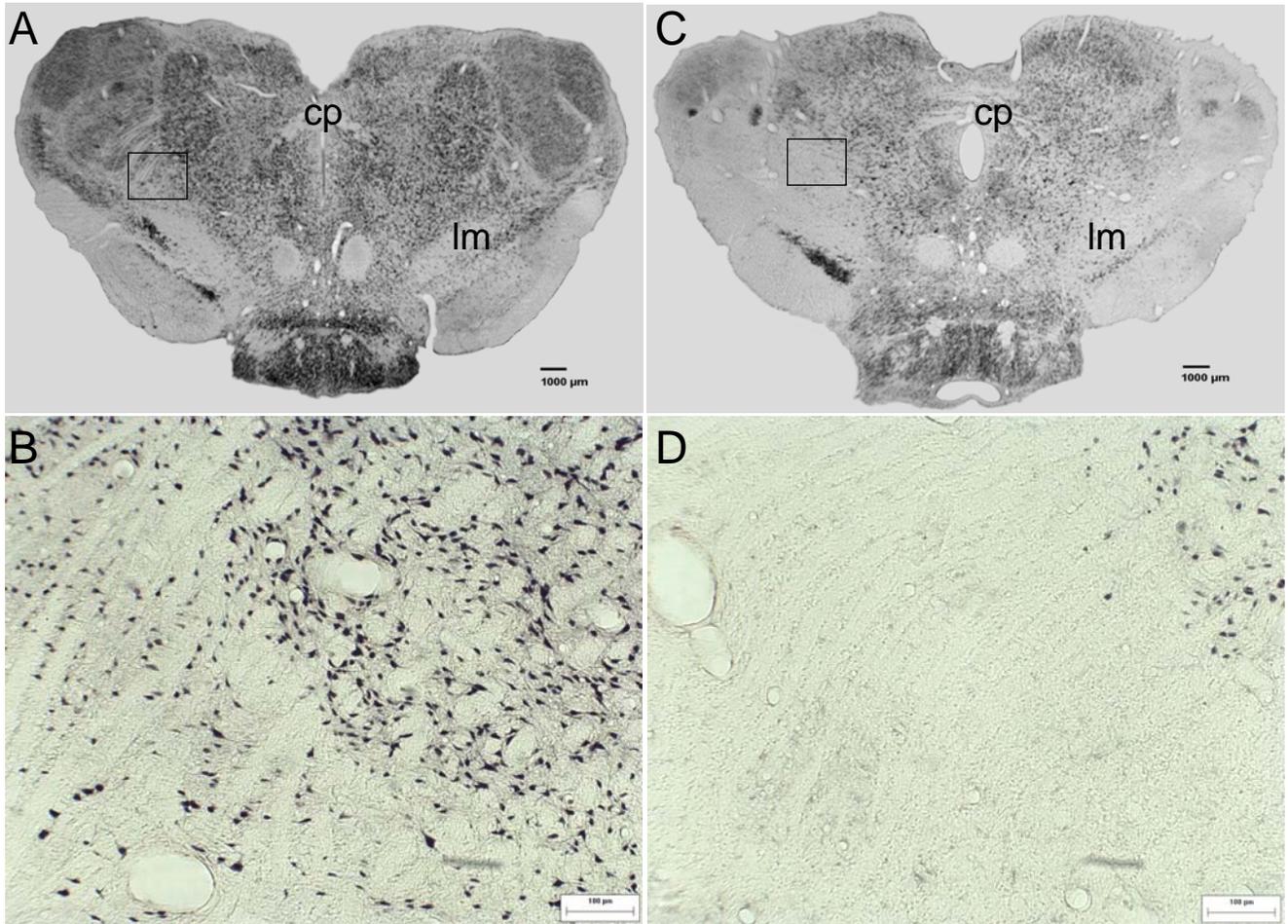
## 4. Resultados histológicos

Sin tener conocimiento de los datos conductuales y dependiendo de la expresión de GFAP y Neu-N catalogamos a los sujetos en diferentes grupos. En un total de ocho animales se observó un incremento de células marcadas con GFAP y una disminución de las inmunorreactivas a Neu-N en ambos lados del CTC (Figura 10 y 11), a este grupo lo denominamos “bilateral”. El promedio de neuronas encontradas en el CTC fue de sólo 22 % de núcleos neuronales respecto del grupo control

(Tabla 5), aunque en tres sujetos se encontró alrededor de 5 % de núcleos neuronales en el CTC respecto de los controles. Otro grupo al que llamamos “otros” sitios fue conformado por 12 animales que tuvieron ya sea lesión unilateral o en los cuales no se detectó lesión. El porcentaje de núcleos cuantificados en este grupo fue del 90 % respecto del grupo control formado por 10 sujetos.



**Figura 10. Fotomicrografías de cortes coronales del mesencéfalo en donde se muestra la inmunorreactividad a la proteína glial ácido fibrilar en el campo tegmental central en una rata inyectada con solución vehículo (A y B) o ácido quinolínico (C y D). Se observa una alta reacción glial en el tejido en donde se inyectó ácido quinolínico en comparación con la inyección de solución vehículo. B y D (10X) son acercamientos de A y C (1X), respectivamente. Abreviaturas: cp=comisura posterior; lm=lemnisco medial.**



**Figura 11. Fotomicrografías de cortes coronales del mesencéfalo en donde se muestra la inmunorreactividad a la proteína neuronal nuclear en el campo tegmental central en una rata inyectada con solución vehículo (A y B) o ácido quinolínico (C y D). Se observa una reducción del número de neuronas luego de la inyección de ácido quinolínico. B y D (10X) son acercamientos de A y C (1X), respectivamente. Abreviaturas: cp=comisura posterior; lm=lemnisco medial.**

**Tabla 5. Cuantificación y porcentaje de neuronas en animales lesionados del CTC**

<b>Nivel respecto a Bregma</b>	<b>Lado</b>	<b>Vehículo (10)</b>	<b>Bilateral (8)</b>	<b>Otros sitios(12)</b>
<b>-4.52</b>	Izquierdo	579	157	449
	Derecho	545	93	461
<b>-4.80</b>	Izquierdo	584	258	592
	Derecho	653	112	623
<b>-5.02</b>	Izquierdo	589	268	571
	Derecho	686	137	587
<b>-5.03</b>	Izquierdo	602	389	585
	Derecho	674	183	598
<b>Promedio</b>		<b>614</b>	<b>199</b>	<b>558</b>
<b>Porcentaje</b>		<b>100</b>	<b>22</b>	<b>90</b>

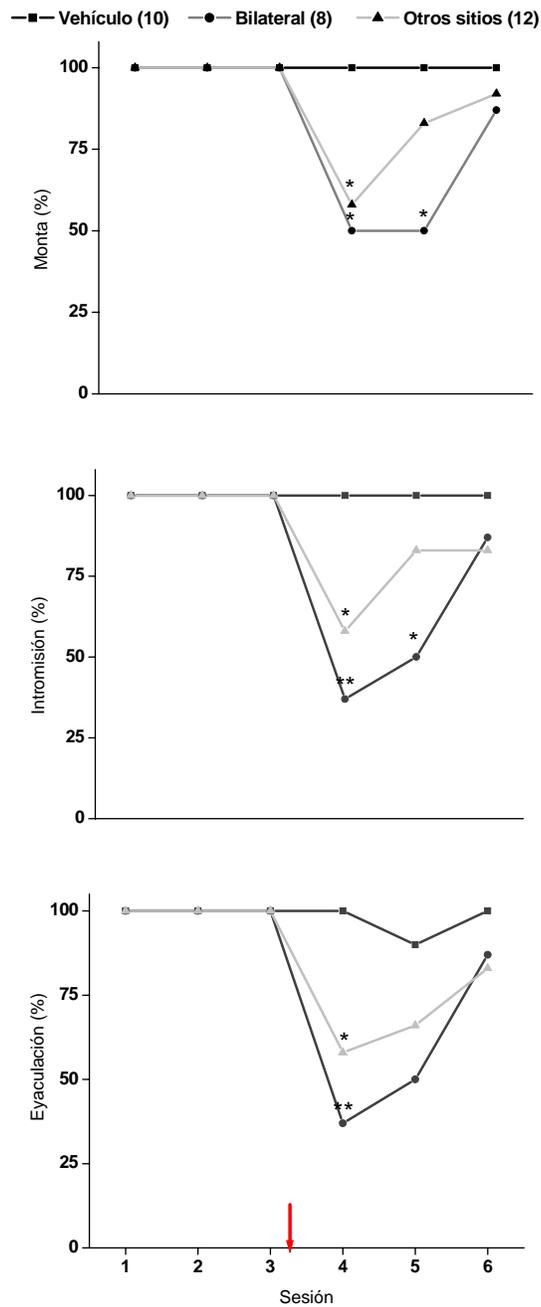
El nivel con respecto a Bregma corresponde a lo mostrado por Paxinos y Watson (1986), en cuyos niveles se contó el número de núcleos neuronales en el CTC de cada lado del cerebro. Los valores son la media para cada nivel de todo el grupo. Los porcentajes en los grupos con lesión fueron respecto al grupo control. En paréntesis se indica el número de sujetos que conforman el grupo.

## **5. Resultados conductuales**

### **5.1 Porcentajes de machos que mostraron conducta sexual**

El porcentaje de machos que realizaron monta [ $X^2(2) = 6.58; p = 0.03$ ], intromisión [ $X^2(2) = 8.43; p = 0.01$ ] y eyaculación [ $X^2(2) = 8.43; p = 0.01$ ] se redujo en la primera sesión post lesión en el grupo bilateral y otro sitio (Figura 12). Los mayores efectos de la lesión se observaron en el grupo con lesión bilateral, donde el porcentaje de machos que montaron se redujo 50 %, mientras el 63% de sujetos no mostró intromisión o eyaculación (Figura 12). En el grupo conformado por los sujetos con

lesión en otros sitios el porcentaje de animales que montaron, intrometieron o eyacularon se redujo en el 40 % de los sujetos. En la segunda sesión post lesión únicamente el grupo con lesión bilateral fue afectado en el porcentaje de sujetos que montaron [ $\chi^2 (2) = 7.08; p=0.02$ ] e intrometieron [ $\chi^2 (2) = 7.08; p=0.02$ ]. En cada caso el porcentaje fue disminuido en el 50 % de los machos (Figura 12). Por último, en la tercera sesión post lesión no hubo cambios significativos por la lesión.



**Figura 12. Porcentaje de machos lesionados en el CTC que mostraron monta, intromisión y eyaculación.** Es evidente la disminución del porcentaje de machos que mostraron monta, intromisión o eyaculación en la primera y segunda sesión post lesión y su recuperación en la tercera prueba post lesión. La flecha indica el momento de la lesión. El número en paréntesis indica cuantos sujetos conforman el grupo. Los datos son la media  $\pm$  error estándar. \*  $p < 0.05$  Diferente del grupo control en la misma sesión; \*\*  $p < 0.01$ .

## 5.2 Frecuencia y latencia de monta e intromisión

El número de montas [ $F(2;29)=0.04$ ;  $p=0.9$ ] e intromisiones [ $F(2; 29)=0.7$ ;  $p=0.40$ ] no se afectó significativamente por la lesión. Por otra parte, en el grupo control y el de otros sitios el número de intromisiones disminuyó de manera significativa en las sesiones post lesión respecto a la tercera sesión pre lesión (Tabla 6).

Se notó un incremento en las latencias de monta [ $F(2;29)=9.40$ ;  $p<0.001$ ], de intromisión [ $F(2;29)=5.65$ ;  $p=0.008$ ], y de eyaculación [ $F(2;29)=3.69$ ;  $p=0.03$ ] producto de la lesión. Aunque en la segunda sesión post lesión se observaron cambios, las alteraciones se detectaron principalmente en la tercera sesión post lesión en el grupo con lesión bilateral respecto del grupo control en la misma sesión (Tabla 6). En el grupo con lesión en otros sitios también se afectó la latencia de monta y de intromisión pero no la latencia de eyaculación. Finalmente, la duración del intervalo post eyaculatorio no se afectó en ninguno de los grupos [ $F(2;29)=0.75$ ;  $p=0.47$ ; (Tabla 6)].

**Tabla 6. Conducta sexual en ratas macho lesionadas bilateralmente del CTC**

Variable	Tratamiento	Pre lesión 3	Post lesión		
			1	2	3
NM	Vehículo	9±2	11±3	14±5	7±1
	Bilateral	8±1	6±1	7±1	14±3
	Otros sitios	9±1	5±1	15±4	9±2
NI	Vehículo	19±2	13±1**	12±1**	12±1**
	Bilateral	18±2	9±1	14±1	13±1
	Otros sitios	13±1	9±1**	8±1**	12±1
LM	Vehículo	68±35	179±136	77±27	81±40
	Bilateral	333±137	337±208	371±127	882±358##
	Otros sitios	352±103##	169±60	558±152##	447±192##
LI	Vehículo	139±100	207±137	115±34	197±127
	Bilateral	481±218	148±29	618±305*#	946±323*##
	Otros sitios	428±120	213±73	797±277*##	553±203*#
LE	Vehículo	732±99	589±90	559±79	444±54*
	Bilateral	636±51	359±77	661±82	830±160*##
	Otros sitios	603±90	392±52*#	458±81	477±71
IPE	Vehículo	527±127	562±143	401±71	357±28
	Bilateral	576±224	332±27	432±102	371±30
	Otros sitios	471±84	476±101	728±263	472±74

Los valores son la media ± error estándar. Abreviaturas: NM=Número de montas; NI= Número de intromisiones; LM=Latencia de monta; LI=Latencia de intromisión; LE=Latencia de eyaculación; IPE=Intervalo posteyaculatorio. ANOVA de medidas repetidas para frecuencia de montas [F(2;29)=0.04; p=0.9], frecuencia de intromisiones [F(2; 29)=0.7; p=0.4], y latencia de eyaculación [F(2;29)=1.56; p=0.22]. Como prueba post hoc practicamos la prueba de Fisher's LSD, # Diferente del grupo vehículo en la misma sesión p<0.05; ## p<0.01. \* Diferente de sesión pre lesión del mismo grupo p<0.05; \*\* p<0.01.

### 5.3 Frecuencia de las conductas sociosexuales

La frecuencia de varias de las conductas sociosexuales se afectó en los animales con lesión bilateral del CTC. El número de persecuciones [X<sup>2</sup>(2)=7.58; p=0.02] y de autoaseos [X<sup>2</sup>(2)=8.58; p=0.01] disminuyeron, mientras que en la frecuencia de exploración de los genitales de la hembra se registró un aumento [X<sup>2</sup>(2)=11.28; p=0.003]. En cada uno de esos casos las diferencias estadísticas

fueron respecto de sus valores prelesión y también de la sesión post lesión con respecto al grupo control. El número de erguidos aumentó pero únicamente con respecto a la sesión post lesión del grupo control [ $X^2(2)=8.85$ ;  $p=0.01$ ; (Tabla 7)]. En cuanto al número de aseos de pareja [ $X^2(2)=5.28$ ;  $p=0.07$ ] y descansos [ $X^2(2)=1.85$ ;  $p=0.39$ ] no encontramos alteraciones.

En el grupo con lesión en otros sitios notamos un incremento en el número de husmeos [ $X^2(2)=10.24$ ;  $p=0.006$ ] y de erguidos [ $X^2(2)=8.85$ ;  $p=0.01$ ], mientras que en los autoaseos notamos una disminución [ $X^2(2)=8.58$ ;  $p=0.01$ ] respecto a la sesión post cirugía del grupo control. En las comparaciones respecto a la prueba pre lesión únicamente observamos incrementos en el número de exploraciones genitales.

**Tabla 7. Frecuencia de interacciones sociosexuales en animales con lesión bilateral del CTC**

Variable	Observación	Grupos		
		Vehículo	Bilateral	Otros sitios
Persecuciones	Pre	31±4	27±4	25±2
	Post	23±2	10±3**#	15±3
Exploración genital	Pre	2±1	4±1	4±1
	Post	5±1	21±2**#	12±2#
Aseo de pareja	Pre	1.6±0.6	3.8±1.3	2.0±0.5
	Post	2.0±0.8	7.0±2.0	5.1±1.3
Auto aseo	Pre	32±2	29±4	25±2
	Post	26±1#	12±3**#	17±2*
Husmeo	Pre	26±3	30±5	37±3
	Post	18±2	30±4	37±3**
Erguido	Pre	12±3	19±2	21±3
	Post	8±2	23±3*	18±2*
Descanso	Pre	44±8	30±6	28±3
	Post	33±7	28±7	24±4

Los valores son la media ± error estándar. # Diferente de prueba pre lesión en el mismo grupo  $p<0.05$ . \* Diferente de vehículo en la misma observación  $p<0.05$ ; \*\*  $p<0.01$ .

#### 5.4 Duración de las conductas sociosexuales

En los grupos con lesión bilateral y otros sitios la duración de exploración genital [X2(2)=13.38; p=0.001], aseo de pareja [X2(2)=7.15; p=0.02], husmeo [X2(2)=10.08; p=0.006] y erguido [X2(2)=9.52; p=0.008] incrementaron, mientras que en la duración de autoaseo [X2(2)=6.90; p=0.03] y descanso [X2(2)=9.99; p=0.006] se notó una disminución respecto del grupo control en la sesión post cirugía (Tabla 8).

La duración de las persecuciones se redujo [X2(2)=7.40; p=0.02] mientras que la exploración genital se incrementó en los grupos con lesión bilateral y otros sitios respecto de la prueba pre lesión (Tabla 8).

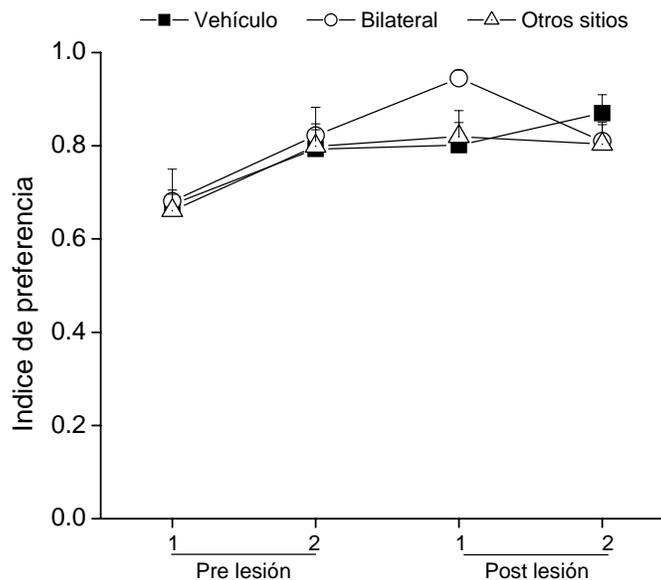
**Tabla 8. Duración de interacción sociosexual en animales lesionados del CTC**

Variable	Observación	Grupos		
		Vehículo	Bilateral	Otros sitios
Persecuciones	Pre	109±12	84±19	84±10
	Post	82±16	24±10**#	43±9#
Exploración genital	Pre	16±6	12±4	12±4
	Post	12±5	106±19**#	53±17*#
Aseo de pareja	Pre	3.0±0.8	10.3±3.6	3.8±0.9
	Post	3.2±1.2	23.3±8.2*	18.2±6.7*
Auto aseo	Pre	228±14	192±30	167±16
	Post	197±22#	88±32*#	127±25*
Husmeo	Pre	96±22	150±34	171±14
	Post	103±21	233±27**	208±26**
Erguido	Pre	22±9	41±6	46±6
	Post	17±4	50±11*	44±6**
Descanso	Pre	132±25	97±25	113±18
	Post	203±29	83±21**	86±16**

Los valores son expresados como la media ± error estándar. # Diferente de prueba pre lesión en el mismo grupo p<0.05. \* Diferente de vehículo en la misma observación p<0.05; \*\* p<0.01.

### 5.5 Preferencia de pareja

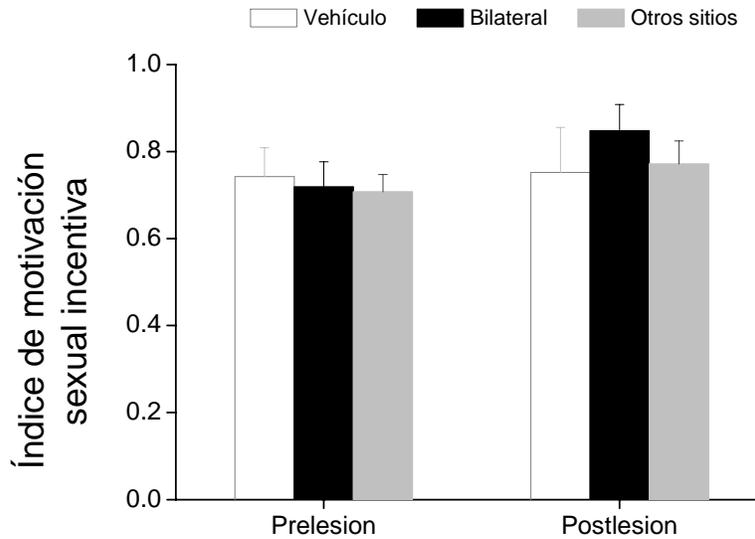
En la figura 13 se muestran los datos obtenidos para la preferencia de pareja. Es evidente que desde la primera sesión los sujetos prefieren interactuar con las hembras que con los machos, tendencia que se acentúa conforme se avanza en las sesiones, incluso en las sesiones post cirugía tanto en los animales control como en los grupos con lesión, sin que se alcanzaran diferencias significativas [ $F(2;29)=0.56$ ;  $p=0.57$ ].



**Figura 13. Índice de preferencia de pareja en sujetos lesionados neurotóxicamente del campo tegmental central.** Los valores por arriba de 0.5 indican preferencia por la hembra receptiva. Los datos graficados son la media  $\pm$  error estándar.

### 5.6 Motivación sexual incentiva

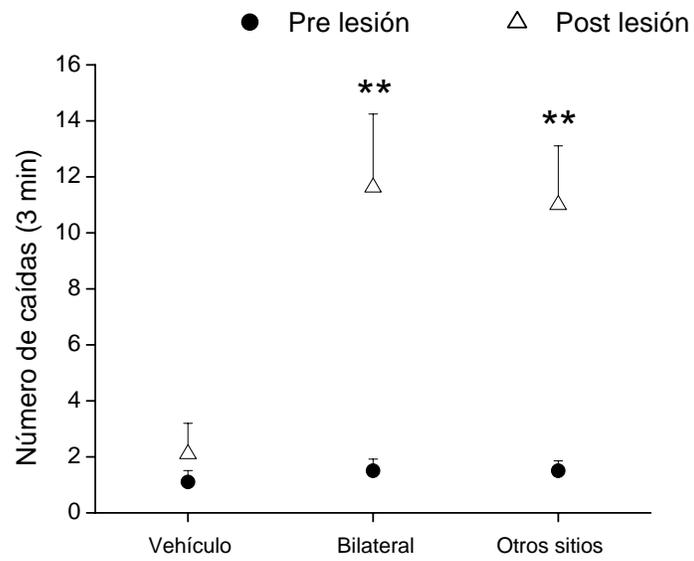
No observamos ninguna alteración en la prueba de motivación sexual incentiva [grupo  $F(2;16)=0.21$ ;  $p=0.81$ ; prueba  $F(1;17)=2.24$ ;  $p=0.15$ ]. En todos los grupos el índice de motivación sexual incentiva osciló alrededor de 0.7 lo que demuestra que los machos con lesión neurotóxica bilateral del CTC siempre tuvieron una preferencia por la hembra sexualmente receptiva (Figura 14).



**Figura 14. Índice de motivación sexual incentiva en animales con lesión bilateral del CTC.** Los datos graficados son media  $\pm$  error estándar.

### 5.7 Ejecución motora

Observamos una alteración en la ejecución motora producto de la lesión [ $F(2;29)=6.44$ ;  $p=0.005$ ]. Esto es, en el grupo con lesión bilateral el número de caídas se incrementó hasta 9 veces con respecto a los valores pre lesión y también con respecto a los valores del grupo control, aunque el efecto fue inespecífico dado que también se notó en el grupo con lesión en otros sitios (Figura 15).



**Figura 15. Número de caídas (media ± error estándar) en animales lesionados bilateralmente del CTC.** Los datos graficados son. \*\*  $p < 0.01$  respecto de pre lesión.

## **6. Discusión**

Las inmunocitoquímicas practicadas para GFAP y Neu-N muestran clara evidencia de que la lesión que se realizó por la inyección de ácido quinolínico sobre el CTC fue superior al 70 % en todos los animales que conformaron al grupo con lesión bilateral. Se notó un incremento importante en la inmunorreactividad a GFAP en el CTC aunque en algunos animales también se encontró lesión en estructuras dorsolaterales al CTC, principalmente en los núcleos geniculados. Por otro lado, la inmunocitoquímica para Neu-N permitió determinar que en tres animales tuvieron solamente 5 % de núcleos neuronales respecto del grupo inyectado con solución vehículo. Esto demuestra que a pesar de que el 95 % de las neuronas fueron lesionadas el despliegue de la conducta sexual no se afectó de manera permanente. Por otra parte, el grupo con lesión en otros sitios tuvo alrededor del 80 % de las neuronas respecto al grupo tratado con solución vehículo y el efecto inhibitorio de la conducta sexual también fue transitorio.

La lesión bilateral del CTC causó una disminución en el porcentaje de sujetos que desplegaron los patrones de monta, intromisión y eyaculación en las dos primeras sesiones post lesión. El grupo con lesión en otros sitios también se afectó, aunque éste se vio únicamente en la primera sesión post lesión. También, la lesión bilateral del CTC incrementó las latencias de monta, intromisión y eyaculación. Mientras que la lesión en otros sitios sólo incrementó las latencias de monta e intromisión. Las conductas sociosexuales se afectaron respecto de sus valores pre lesión. En el grupo con lesión bilateral se notó un incremento en la frecuencia y duración de la exploración genital, mientras que se notó una disminución en el número y tiempo de persecución de la hembra y autoaseo. En el grupo con lesión en otros sitios se incrementó la frecuencia y el tiempo de exploración de los genitales de la hembra y disminuyó el tiempo de persecución hacia la hembra. Las conductas sociosexuales restantes no sufrieron cambios. La motivación sexual incentiva y la preferencia de pareja no tuvieron ningún cambio. Finalmente, el desempeño en la ejecución motora se vio ampliamente afectado, aunque los

efectos no fueron específicos para el grupo con lesión bilateral, ya que se observaron alteraciones en la misma proporción en el grupo con lesiones fuera del CTC.

Simerly y Swanson (1986) demostraron inyectando el trazador anterógrado *L-Phaseolus vulgaris* en el APM que esta estructura proyecta al CTC. Posteriormente el grupo de Coolen (1998) inyectando la subunidad  $\beta$  de la toxina de cólera (trazador retrógrado) o el dextrano amino biotilado (trazador anterógrado) confirmaron las interconexiones entre el APM y el CTC. Por otra parte, Baum y Everitt (1992) demostraron que se expresa la proteína fos en el APM únicamente si el animal copula. Con esto sugirieron que la conexión entre el APM y el CTC son importantes porque el CTC provee información sensorial al APM, tal como se explicó en el apartado de la introducción. A pesar de que esas evidencias sugieren que el CTC participa en el control de la cópula, este es el primer estudio en donde se lesionó neurotóxicamente y bilateralmente el CTC para evaluar la participación de esas neuronas en la conducta sexual. Aunque en nuestro laboratorio se hizo un intento por determinar el papel del CTC en la conducta sexual masculina (Giordano y cols., 2001). En ese experimento se practicó una lesión del tipo electrolítica y se encontró un abatimiento total y permanente de la cópula (Giordano y cols., 2001). Sin embargo, esos datos no nos permiten aseverar si la lesión de las neuronas del CTC afecta la cópula, ya que la lesión fue electrolítica y como se ha explicado ese tipo de lesiones produce daño a neuronas y a los axones que viajan por el área lesionada. Por ello, la inhibición de la cópula observada en los animales lesionados electrolíticamente no descarta la posibilidad de que ésta se perdió debido a la interrupción de las conexiones del APM con estructuras caudales al CTC aspecto que se trata en el apartado correspondiente a la discusión general. Por otra parte, la inactivación temporal de los somas y axones que cruzan al CTC mediante la inyección de lidocaína produce una inhibición total de la conducta sexual en el 80 % de los sujetos, mientras que en el restante 20 % de los animales se observaron montas e intromisiones pero no eyaculación (Hurtazo, comunicación personal), lo que sugieren también una participación del CTC en el control de la cópula, sin embargo, tampoco se

descarta el que la inhibición de la cópula se haya debido a la interrupción de el flujo de información entre el APM y estructuras caudales al CTC.

Dado que en este experimento la lesión neurotóxica bilateral del CTC no inhibió de manera permanente el despliegue de la cópula se sugiere que las neuronas de esta área no son determinantes en el control de la conducta sexual masculina. Aunque los datos muestran que la lesión del CTC incrementó las latencias de monta y eyaculación, así como también redujo la frecuencia de persecuciones, estos parámetros no son contundentes en la evaluación de la motivación sexual, dado que alteraciones motoras y en los sistemas sensoriales pueden incrementar esas variables (Hull y cols., 2003). Una alteración en los sistemas sensoriales pudo ser el resultado de la lesión del CTC y por ello también se redujo en tiempo de exploraciones de los genitales de la hembra así como el tiempo de persecución durante los primeros diez minutos de observación, parámetros que se ha sugerido son una medida indirecta de la motivación sexual (Agmo, 1999; Meisel y Sachs, 1994; Paredes y cols., 1993a). Sugerimos que no existe una reducción en la motivación sexual porque los animales siguen prefiriendo en las pruebas de motivación sexual incentiva a las hembras sexualmente receptivas y no a los machos sexualmente activos, de la misma manera que sucede en la prueba de preferencia de pareja, pruebas que también son una herramienta más para estudiar la motivación sexual (Paredes y Agmo, 2004). Por otra parte.

Por otra parte, los incrementos en las latencias de intromisión y eyaculación sugieren que existe un efecto en la ejecución de la cópula, ya que esas variables son algunas de las consideradas para evaluar la ejecución de la conducta sexual masculina (Meisel y Sachs, 1994), la que puede estar asociada al daño motor que observamos en la ejecución motora en la prueba del rota rod.

Resulta interesante saber si los efectos producidos por la lesión bilateral del CTC anteriormente mencionados son permanentes o si se reducen con el incremento de sesiones copulatorias hasta alcanzar los valores pre lesión. Los resultados en este trabajo sugieren una recuperación conforme pasan los días, lo que puede ser debido a una fenómeno de plasticidad neuronal, tal como se puso de

manifiesto en la discusión del primer experimento. Esto también nos permite explicar la recuperación más rápida observada en el grupo con lesión en otros sitios, dado que una lesión parcial en el CTC puede requerir de menos tiempo para recuperar su función a través de plasticidad neuronal.

De manera generalizada se ha postulado que el CTC participa en el control de la información somatosensorial perigenital porque en esta área se observa un incremento en el número de neuronas inmunoreactivas a la proteína fos cuando los animales tienen intromisiones o eyaculan (Baum y Everitt, 1992b; Boehm, 2006; Coolen, 2005; Coolen y cols., 1997a; Coolen y cols., 1996; Coolen y cols., 1997b; Coolen y cols., 1998; Coolen y cols., 2003a; Coolen y cols., 2003b; Oboh y cols., 1995; Pankevich y cols., 2004). Por otra parte, la inyección de lidocaina en la región perigenital incrementa el número de montas y reduce el número de intromisiones, y bajo esas condiciones no se observa expresión de la proteína fos en el CTC (Baum y Everitt, 1992b; Oboh y cols., 1995). Más aún, la lesión del nervio pélvico produce un incremento en el número de montas pero el animal es incapaz de intrometer, y asociado con ello no se observa expresión de fos en el CTC (Wersinger y cols., 1993). Esos datos sugirieron que el CTC está involucrado en el control sensorial perigenital. Sin embargo, los resultados obtenidos en este experimento no apoyan dicha hipótesis, porque la lesión del CTC no incrementó el número de montas como se esperaba, tal como se pudo observar en la tercera sesión post lesión en donde el 80 % de los animales iniciaron la cópula montando y la continuaron hasta eyacular, y además, el número de intromisiones requeridas para eyacular fue muy similar a las realizadas por los sujetos control.

## **IX. Discusión general**

Varios estudios de neuroanatomía inyectando trazadores neuronales han mostrado que el APM da origen a axones que llegan o pasan por el TDL y por el CTC (Coolen y cols., 1998; Coolen cols., 2003a; Murphy y cols., 1999; Simerly y Swanson, 1988; Swanson y cols., 1978), y que éstos son importantes en el control de la conducta sexual masculina (Brackett y Edwards, 1984; Paxinos, 1973; Paxinos y Bindra, 1973). Los experimentos que realizamos en este trabajo que en esencia fueron lesiones neurotóxicas bilaterales del TDL y CTC sugieren que las neuronas de estas estructuras son importantes pero no determinantes en el control de la conducta sexual masculina, mientras que los axones que pasan por estas estructuras si pueden ser determinantes en el control de la conducta sexual masculina, por lo que también otras estructuras posteriores al TDL y CTC pueden ser las responsables del control de la cópula. Al respecto existen algunas evidencias que pueden darnos algún indicio. Por ejemplo, lesiones del núcleo tegmental pedunculopontino (TPP) en ratas sexualmente inexpertas disminuye el número de montas, intromisiones y de eyaculaciones, así como también disminuye la preferencia por una hembra sexualmente receptiva (Figura 16). Sin embargo, cuando la lesión se hizo en machos sexualmente expertos no se encontró ninguna alteración en el despliegue de la conducta sexual. Esos resultados fueron interpretados como que el TPP es crucial solamente para la adquisición del aprendizaje de la cópula (Kippin y van der Kooy, 2003). Por otra parte, cortes con navaja de la formación reticular ventral (FRV; Figura 16), produce alteraciones en la ejecución de la cópula. En esos trabajos realizados por Paxinos y Bindra se demostró que el número de eyaculaciones se redujo de manera significativa en pruebas que tuvieron una duración de 40 min (Paxinos, 1973; Paxinos y Bindra, 1973). De manera interesante se observó que los animales con este tipo de lesión se recuperaron después de la segunda sesión post lesión, por lo que para la tercera sesión nuevamente volvieron a copular y no se observó ninguna diferencia respecto a los sujetos control (Paxinos, 1973). El campo retrorrubral (CRR; Figura 16) puede ser otra región importante en el control de la conducta sexual masculina. Al respecto, se ha demostrado que las conexiones del APM con el CRR son importantes

para el despliegue de la conducta sexual masculina en el gerbo (Finn y Yahr, 1994; Finn y Yahr, 2005). Lesiones bilaterales del CRR (Finn y Yahr, 1994), así como la destrucción unilateral del APM y contralateral del CRR (Finn y Yahr, 2005) produce un déficit total de la conducta sexual en el gerbo. Sin embargo, en la rata la lesión neurotóxica del CRR solamente tuvo efectos inhibitorios temporales sobre la conducta sexual masculina (Finn y Yahr, 2005). En base a los antecedentes previos, las evidencias de posibles núcleos localizados caudalmente al APM no son concluyentes. Muchas áreas reciben proyecciones del APM que pasan por el TDL y por el CTC, y para determinar cual de ellas es importante en el control de la conducta sexual se requiere de futuros estudios. Aunque otras estructuras que deben considerarse son el núcleo del rafe magno (RM) y el núcleo obscuro (NO), así como también el núcleo reticular gigantocelular ventral (RG) y el núcleo paragigantocelular (Figura 16). Esas áreas reciben y envían proyecciones al APM y están conectadas a las motoneuronas espinales que inervan los músculos del pene (para una discusión vea Finn y Yahr, 2005), por lo que estas estructuras pueden ser candidatos ideales para integrar el circuito neuronal incluido en la regulación de la conducta sexual del macho.

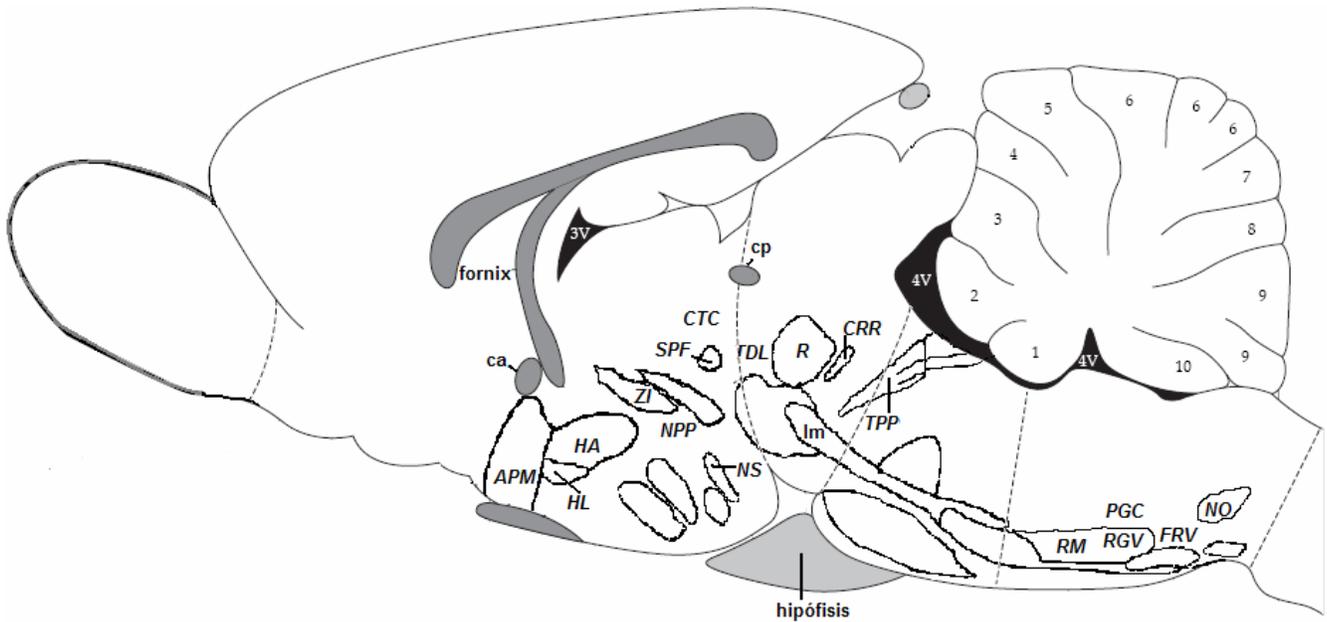
En el caso particular del núcleo paragigantocelular (PGC) se ha demostrado que sus neuronas son inmunoreactivas a fos después de que los animales copulan (Hamson y Watson, 2004b). Además, se ha observado que las neuronas de dicho núcleo tienen receptores a andrógenos, de ahí la idea de que es una estructura que controla de manera importante la conducta sexual de la rata macho (Hamson y cols., 2004a). Un estudio en donde se hizo lesión electrolítica del PGC demostró que el porcentaje de machos sexualmente inexpertos que eyaculan en la primera sesión se incrementa, reduciéndose además el número de montas y de intromisiones pre eyaculatorias (Yells y cols., 1992). Respuestas que los autores interpretaron como un incremento en la motivación sexual.

Algunas áreas anteriores al TDL parecen también jugar un papel importante en el control de la cópula. Tal es el caso del núcleo peripeduncular (NPP), un área localizada rostral y lateral al TDL, que al ser lesionada con ácido iboténico produce una reducción significativa del número de animales que

eyaculan, pero no afecta el número de montas ni de intromisiones pre eyaculatorias en los animales que logran copular (Hansen y Kohler, 1984). Así también, la lesión de la zona incerta que está localizada entre el NPP y el TDL, también produce alteraciones en la ejecución de la cópula, de manera similar a lo observado con la lesión del TDL, las lesiones de la porción posterior de la zona incerta inhibe en el 50 % de los animales la eyaculación (Maillard y Edwards, 1991), mientras que la lesión de la porción caudal de la zona incerta produjo cambios drásticos en la conducta sexual afectando en todos la eyaculación, sin embargo, los animales lesionados mostraron montas incompletas, esto es, montas que no fueron acompañadas por movimientos pélvicos. Estos animales mostraron también una clara preferencia por hembras receptivas. Las alteraciones observadas en la conducta sexual fueron atribuidas a alteraciones en la locomoción y no a la disminución de la motivación sexual (Edwards y Isaacs, 1991). Por otra parte, la inyección bilateral de NMDA en la región subtalámica disminuyó de manera significativa el porcentaje de machos que muestran monta y eyaculación. La lesión más efectiva incluyó daño bilateral de la porción caudal de la zona incerta (ZI), hipotálamo lateral adyacente (HL) y al núcleo subtalámico (NS). Algunas de las lesiones que eliminaron la conducta sexual incluyeron al campo tegmental central (para discusión ver (Maillard-Gutekunst y Edwards, 1994).

Otra área importante en el control de la conducta sexual masculina es el núcleo talámico subparafacicular en su porción parvocelular, un área localizada rostral al TDL y caudal a la zona incerta y la cual se le considera como parte del CTC. Esta estructura expresa fos únicamente en su porción medial sólo después de la eyaculación, pero no cuando se despliegan montas o intromisiones (Coolen y cols., 2003a). El SPFp recibe aferentes de neuronas localizadas en la médula espinal en las región L6, estas neuronas son de tipo galaninérgico, colicistokinérgico y encefalinérgico (Truitt y Coolen, 2002). Esas aferentes se encuentran de manera bien localizada a nivel del núcleo SPFp, ubicándose principalmente en la parte medial de dicho núcleo y siendo principalmente de tipo galaninérgico, mientras que otras fibras que expresan a la proteína del gen de la calcitonina se ubica en la porción lateral (Coolen y cols., 2003a). En este trabajo observamos en algunos animales lesión en alguna

porción del SPF, aunque no pudimos determinar con precisión el tamaño de la lesión del SPF debido a que para ello se requiere una inmunocitoquímica para neuronas galaninérgicas, tal como se describieron por Coolen y colaboradores (2003b).



**Figura 16. Esquema de corte sagital de cerebro de rata que muestra la posición de núcleos posteriores al APM (mayúsculas) que pueden estar involucradas con la regulación de la cópula.** Abreviaturas: APM: área preóptica medial; CRR: campo retrorrubral; CTC: campo tegmental central; FRV: formación reticular ventral; HA: Hipotálamo anterior; HL: Hipotálamo lateral; NPP: núcleo peripeduncular; NO: núcleo obscuro; NS: núcleo subtalámico; PGC: núcleo paragigantocelular; R: núcleo rojo; RGV: núcleo reticular gigantocelular ventral; RM: rafe magno; TPP: núcleo tegmental pedunculopontino; ZI: zona incierta. Abreviaturas de sitios de referencia: 1-10: lóbulos cerebrales; 3V: tercer ventrículo; 4V: cuarto ventrículo; ca: comisura anterior; cp: comisura posterior. El APM tiene conexiones con todas las estructuras que se observan en el esquema. Se postuló que las conexiones del APM con el TDL y el CTC participan en el control de conducta sexual masculina dado que se activan con la cópula y en el caso del TDL la lesión electrolítica inhibe de manera permanente el despliegue de la cópula. Los resultados del presente trabajo demuestran que las lesiones neurotóxicas no inhiben completamente la cópula sugiriendo que los axones que pasan por el TDL y el CTC son los que llevan la información a estructuras posteriores, tal como el TPP, CRR y el PGC. Esta hipótesis deberá ser corroborada con estudios posteriores.

En resumen, la lesión neurotóxica bilateral del TDL y del CTC tuvieron solamente efectos temporales sobre la ejecución de la conducta sexual masculina, lo que sugiere que las neuronas de estas estructuras no están comprometidas con la ejecución de la cópula, tal como lo pueden estar los axones que cruzan estas estructuras. Esos axones pueden ser originados en el APM, la cual esta implicada en el control de la motivación sexual. Una vez que el animal esta motivado requiere activar su sistema motor para realizar montas, intromisiones y eyacular. Los axones que pasan por el TCL y el CTC inervan diferentes estructuras en el cerebro medio como en el tallo cerebral, e incluso a nivel espinal. La identificación de los circuitos funcionales entre esos núcleos podrá darnos un mayor conocimiento de los circuitos neuronales incluidos en el control de la conducta sexual masculina.

## X. Bibliografía

- Ackerman, A. E., Lange, G. M., and Clemens, L. G. (1997). Effects of paraventricular lesions on sex behavior and seminal emission in male rats. *Physiol Behav* **63**(1), 49-53.
- Agmo, A. (1999). Sexual motivation--an inquiry into events determining the occurrence of sexual behavior. *Behav Brain Res* **105**(1), 129-50.
- Agmo, A. (2002). Copulation-contingent aversive conditioning and sexual incentive motivation in male rats: evidence for a two-stage process of sexual behavior. *Physiol Behav* **77**(2-3), 425-35.
- Agmo, A., and Gomez, M. (1993). Sexual reinforcement is blocked by infusion of naloxone into the medial preoptic area. *Behav Neurosci* **107**(5), 812-8.
- Agmo, A., Paredes, R., and Fernandez, H. (1987). Differential effects of GABA transaminase inhibitors on sexual behavior, locomotor activity, and motor execution in the male rat. *Pharmacol Biochem Behav* **28**(1), 47-52.
- Agmo, A., and Pfaff, D. W. (1999). Research on the neurobiology of sexual behavior at the turn of the millennium. *Behav Brain Res* **105**(1), 1-4.
- Agmo, A., and Vega Matuszczyk, J. (2003). From rat sexual behavior to schizophrenia: A tribute to Professor Emeritus Knut Larsson. *Scand J Psychol* **44**(3), 169-171.
- Agmo, A., Villalpando, A., Picker, Z., and Fernandez, H. (1995). Lesions of the medial prefrontal cortex and sexual behavior in the male rat. *Brain Res* **696**(1-2), 177-86.
- Aou, S., Yoshimatsu, H., and Oomura, Y. (1984). Medial preoptic neuronal responses to connatural females in sexually inactive male monkeys (*Macaca fuscata*). *Neurosci Lett* **44**(2), 217-21.
- Baum, M. J. (1992a). Neuroendocrinology of sexual behavior in the male. . In S. M. B. y. D. C. J.B. Becker (Ed.), *Behavioral Endocrinology*, pp. 97-139.
- Baum, M. J., and Everitt, B. J. (1992b). Increased expression of c-fos in the medial preoptic area after mating in male rats: role of afferent inputs from the medial amygdala and midbrain central tegmental field. *Neuroscience* **50**(3), 627-46.
- Beach, F. A., and Jordan, L. (1956). Sexual exhaustion and recovery in the male rat. *Quarterly Journal of Experimental Psychology*. **8**, 249-254.
- Belhaj-Saif, A., and Cheney, P. D. (2000). Plasticity in the distribution of the red nucleus output to forearm muscles after unilateral lesions of the pyramidal tract. *J Neurophysiol* **83**(5), 3147-53.
- Beynon, R. J., and Hurst, J. L. (2004). Urinary proteins and the modulation of chemical scents in mice and rats. *Peptides* **25**(9), 1553-63.
- Bjorklund, H., Olson, L., Dahl, D., and Schwarcz, R. (1986). Short- and long-term consequences of intracranial injections of the excitotoxin, quinolinic acid, as evidenced by GFA immunohistochemistry of astrocytes. *Brain Res* **371**(2), 267-77.
- Boehm, U. (2006). The vomeronasal system in mice: from the nose to the hypothalamus- and back! *Semin Cell Dev Biol* **17**(4), 471-9.
- Brackett, N. L., and Edwards, D. A. (1984). Medial preoptic connections with the midbrain tegmentum are essential for male sexual behavior. *Physiol Behav* **32**(1), 79-84.
- Brackett, N. L., Iuvone, P. M., and Edwards, D. A. (1986). Midbrain lesions, dopamine and male sexual behavior. *Behav Brain Res* **20**(2), 231-40.
- Cagiano, R., Barfield, R. J., White, N. R., Pleim, E. T., and Cuomo, V. (1989). Mediation of rat postejaculatory 22 kHz ultrasonic vocalization by dopamine D2 receptors. *Pharmacol Biochem Behav* **34**(1), 53-8.
- Carr, W. J., Loeb, L. S., and Dissinger, M. L. (1965). Responses of Rats to Sex Odors. *J Comp Physiol Psychol* **59**, 370-7.
- Carr, W. J., Loeb, L. S., and Wylie, N. R. (1966). Responses to feminine odors in normal and castrated male rats. *J Comp Physiol Psychol* **62**(2), 336-8.

- Carr, W. J., Solberg, B., and Pfaffmann, C. (1962). The olfactory threshold for estrous female urine in normal and castrated male rats. *J Comp Physiol Psychol* **55**, 415-7.
- Claro, F., Segovia, S., Guilamon, A., and Del Abril, A. (1995). Lesions in the medial posterior region of the BST impair sexual behavior in sexually experienced and inexperienced male rats. *Brain Res Bull* **36**(1), 1-10.
- Conrad, L. C., and Pfaff, D. W. (1976). Efferents from medial basal forebrain and hypothalamus in the rat. I. An autoradiographic study of the medial preoptic area. *J Comp Neurol* **169**(2), 185-219.
- Coolen, L. M. (2005). Neural control of ejaculation. *J Comp Neurol* **493**(1), 39-45.
- Coolen, L. M., Olivier, B., Peters, H. J., and Veening, J. G. (1997a). Demonstration of ejaculation-induced neural activity in the male rat brain using 5-HT1A agonist 8-OH-DPAT. *Physiol Behav* **62**(4), 881-91.
- Coolen, L. M., Peters, H. J., and Veening, J. G. (1996). Fos immunoreactivity in the rat brain following consummatory elements of sexual behavior: a sex comparison. *Brain Res* **738**(1), 67-82.
- Coolen, L. M., Peters, H. J., and Veening, J. G. (1997b). Distribution of Fos immunoreactivity following mating versus anogenital investigation in the male rat brain. *Neuroscience* **77**(4), 1151-61.
- Coolen, L. M., Peters, H. J., and Veening, J. G. (1998). Anatomical interrelationships of the medial preoptic area and other brain regions activated following male sexual behavior: a combined fos and tract-tracing study. *J Comp Neurol* **397**(3), 421-35.
- Coolen, L. M., Veening, J. G., Petersen, D. W., and Shipley, M. T. (2003a). Parvocellular subparafascicular thalamic nucleus in the rat: anatomical and functional compartmentalization. *J Comp Neurol* **463**(2), 117-31.
- Coolen, L. M., Veening, J. G., Wells, A. B., and Shipley, M. T. (2003b). Afferent connections of the parvocellular subparafascicular thalamic nucleus in the rat: evidence for functional subdivisions. *J Comp Neurol* **463**(2), 132-56.
- Cooper, J. R., Bloom, F. E., and Roth, R. H. (2003). *The biochemical basis of neuropharmacology*, Eighth edition ed. Oxford New York, New York.
- Crews, D. (1998). The evolutionary antecedents to love. *Psychoneuroendocrinology* **23**(8), 751-64.
- de Jonge, F. H., Oldenburger, W. P., Louwerse, A. L., and Van de Poll, N. E. (1992). Changes in male copulatory behavior after sexual exciting stimuli: effects of medial amygdala lesions. *Physiol Behav* **52**(2), 327-32.
- Dominguez-Salazar, E., Portillo, W., Baum, M. J., Bakker, J., and Paredes, R. G. (2002). Effect of prenatal androgen receptor antagonist or aromatase inhibitor on sexual behavior, partner preference and neuronal Fos responses to estrous female odors in the rat accessory olfactory system. *Physiol Behav* **75**(3), 337-46.
- Dominguez-Salazar, E., Portillo, W., Velazquez-Moctezuma, J., and Paredes, R. G. (2003). Facilitation of male-like coital behavior in female rats by kindling. *Behav Brain Res* **140**(1-2), 57-64.
- Dominguez, J., Riolo, J. V., Xu, Z., and Hull, E. M. (2001). Regulation by the medial amygdala of copulation and medial preoptic dopamine release. *J Neurosci* **21**(1), 349-55.
- Dominguez, J. M., and Hull, E. M. (2001). Stimulation of the medial amygdala enhances medial preoptic dopamine release: implications for male rat sexual behavior. *Brain Res* **917**(2), 225-9.
- Dvorska, I., Hlinak, Z., and Roth, Z. (1986). Sexual interaction in adult laboratory rats: importance of female's stimuli and of male's experience. *Act Nerv Super (Praha)* **28**(3), 174-81.
- Edwards, D. A., and Einhorn, L. C. (1986). Preoptic and midbrain control of sexual motivation. *Physiol Behav* **37**(2), 329-35.
- Edwards, D. A., and Isaacs, S. (1991). Zona incerta lesions: effects on copulation, partner-preference and other socio-sexual behaviors. *Behav Brain Res* **44**(2), 145-50.

- Edwards, D. A., and Maillard, C. A. (1988). Subthalamic and mesencephalic locomotor regions: brain damage augments the importance of female movement for the display of sexual behavior in male rats. *Physiol Behav* **44**(6), 803-9.
- Edwards, D. A., Walter, B., and Liang, P. (1996). Hypothalamic and olfactory control of sexual behavior and partner preference in male rats. *Physiol Behav* **60**(5), 1347-54.
- Escobar-Briones C, A.-R. R. (2002). ¿Que son las conductas motivadas? Una breve historia. In A.-R. R. Escobar-Briones C (Ed.), *Motivación y Conducta: sus bases biológicas.*, pp. 1-11, México.
- Everitt, B. J., and Stacey, P. (1987). Studies of instrumental behavior with sexual reinforcement in male rats (*Rattus norvegicus*): II. Effects of preoptic area lesions, castration, and testosterone. *J Comp Psychol* **101**(4), 407-19.
- Fanardjian, V. V., Papoyan, E. V., Hovhannisyan, E. A., Melik-Moussian, A. B., Gevorkyan, O. V., and Pogossian, V. I. (2000). The role of some brain structures in the switching of the descending influences in operantly conditioned rats. *Neuroscience* **98**(2), 385-95.
- Fewell, G. D., and Meredith, M. (2002). Experience facilitates vomeronasal and olfactory influence on Fos expression in medial preoptic area during pheromone exposure or mating in male hamsters. *Brain Res* **941**(1-2), 91-106.
- Finn, P. D., and Yahr, P. (1994). Projection of the sexually dimorphic area of the gerbil hypothalamus to the retrorubral field is essential for male sexual behavior: role of A8 and other cells. *Behav Neurosci* **108**(2), 362-78.
- Finn, P. D., and Yahr, P. (2005). Projection from the ventral bed nucleus of the stria terminalis to the retrorubral field in rats and the effects of cells in these areas on mating in male rats versus gerbils. *Horm Behav* **47**(2), 123-38.
- Giordano, M., Guemes, M., Lopez-Arias, V., and Paredes, R. G. (1998). Socio-sexual behavior in male rats after lesions of the dorsolateral tegmentum. *Physiol Behav* **65**(1), 89-94.
- Giordano, M., Lopez-Arias, V., and Paredes, R. G. (2001). Combined mesencephalic and hypothalamic transplants reverse lesion-induced sexual behavior deficits in the male rat. *Behav Brain Res* **120**(1), 97-104.
- Graig, J. V., Casida, L.E., Chapman A.B. (1954). Male infertility associated whit lack of libido in the rat. *The american naturalist.* **88**(842), 365-372.
- Greco, B., Edwards, D. A., Zumpe, D., Michael, R. P., and Clancy, A. N. (1998). Fos induced by mating or noncontact sociosexual interaction is colocalized with androgen receptors in neurons within the forebrain, midbrain, and lumbosacral spinal cord of male rats. *Horm Behav* **33**(2), 125-38.
- Halpern, M., and Martinez-Marcos, A. (2003). Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Prog Neurobiol* **70**(3), 245-318.
- Hamson, D. K., Jones, B. A., and Watson, N. V. (2004a). Distribution of androgen receptor immunoreactivity in the brainstem of male rats. *Neuroscience* **127**(4), 797-803.
- Hamson, D. K., and Watson, N. V. (2004b). Regional brainstem expression of Fos associated with sexual behavior in male rats. *Brain Res* **1006**(2), 233-40.
- Hansen, S., and Kohler, C. (1984). The importance of the peripeduncular nucleus in the neuroendocrine control of sexual behavior and milk ejection in the rat. *Neuroendocrinology* **39**(6), 563-72.
- Hansen, S., Kohler, C., Goldstein, M., and Steinbusch, H. V. (1982c). Effects of ibotenic acid-induced neuronal degeneration in the medial preoptic area and the lateral hypothalamic area on sexual behavior in the male rat. *Brain Res* **239**(1), 213-32.
- Hardy, K. R. (1964). An Appetitional Theory of Sexual Motivation. *Psychol Rev* **71**, 1-18.
- Heimer, L., and Larsson, K. (1966/1967). Impairment of mating behavior in male rats following lesions in the preoptic-anterior hypothalamic continuum. *Brain Res* **3**, 248-263.
- Heimer L., L. K. (1966/1967). Impairment of mating behavior in male rats following lesions in the preoptic-anterior hypothalamic continuum. *Brain Res* **3**, 248-263.

- Hernandez-Gonzalez, M., Guevara, M. A., Morali, G., and Cervantes, M. (1997). Subcortical multiple unit activity changes during rat male sexual behavior. *Physiol Behav* **61**(2), 285-91.
- Hlinak, Z. (1986). Precopulatory behaviour of laboratory rat: an ethological approach. *Act Nerv Super (Praha)* **28**(2), 108-16.
- Hlinak, Z. (1990a). Precopulatory behaviour in male rats: ethological analysis and functional considerations. *Act Nerv Super (Praha)* **32**(1), 12-34.
- Hlinak, Z. (1990b). Precopulatory behaviour of male rats: developmental aspects and dependence on female's solicitation. *Act Nerv Super (Praha)* **32**(4), 264-82.
- Hosokawa, N., and Chiba, A. (2005). Effects of sexual experience on conspecific odor preference and estrous odor-induced activation of the vomeronasal projection pathway and the nucleus accumbens in male rats. *Brain Res* **1066**(1-2), 101-8.
- Hull, E. M., Lorrain, D. S., Du, J., Matuszewich, L., Lumley, L. A., Putnam, S. K., and Moses, J. (1999). Hormone-neurotransmitter interactions in the control of sexual behavior. *Behav Brain Res* **105**(1), 105-16.
- Jiang, M., and Behbehani, M. M. (2001). Physiological characteristics of the projection pathway from the medial preoptic to the nucleus raphe magnus of the rat and its modulation by the periaqueductal gray. *Pain* **94**(2), 139-47.
- Johnston, R. E. (1998). Pheromones, the vomeronasal system, and communication. From hormonal responses to individual recognition. *Ann N Y Acad Sci* **855**, 333-48.
- Karen, L. M., and Barfield, R. J. (1975). Differential rates of exhaustion and recovery of several parameters of male rat sexual behavior. *J Comp Physiol Psychol* **88**(2), 693-703.
- Keller, M., Douhard, Q., Baum, M. J., and Bakker, J. (2006). Sexual experience does not compensate for the disruptive effects of zinc sulfate-lesioning of the main olfactory epithelium on sexual behavior in male mice. *Chem Senses* **31**(8), 753-62.
- Keverne, E. B. (2005). Odor here, odor there: chemosensation and reproductive function. *Nat Neurosci* **8**(12), 1637-8.
- Kevetter, G. A., and Winans, S. S. (1981a). Connections of the corticomedial amygdala in the golden hamster. I. Efferents of the "vomeronasal amygdala". *J Comp Neurol* **197**(1), 81-98.
- Kevetter, G. A., and Winans, S. S. (1981b). Connections of the corticomedial amygdala in the golden hamster. II. Efferents of the "olfactory amygdala". *J Comp Neurol* **197**(1), 99-111.
- Kippin, T. E., and van der Kooy, D. (2003). Excitotoxic lesions of the tegmental pedunculopontine nucleus impair copulation in naive male rats and block the rewarding effects of copulation in experienced male rats. *Eur J Neurosci* **18**(9), 2581-91.
- Kondo, Y. (1992). Lesions of the medial amygdala produce severe impairment of copulatory behavior in sexually inexperienced male rats. *Physiol Behav* **51**(5), 939-43.
- Kondo, Y., Sudo, T., Tomihara, K., and Sakuma, Y. (2003). Activation of accessory olfactory bulb neurons during copulatory behavior after deprivation of vomeronasal inputs in male rats. *Brain Res* **962**(1-2), 232-6.
- Kovacs, K. J. (1998). c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem Int* **33**(4), 287-97.
- Lanciego, J. L., and Wouterlood, F. G. (2000). Neuroanatomical tract-tracing methods beyond 2000: what's now and next. *J Neurosci Methods* **103**(1), 1-2.
- Larsson, K. (1956). *Conditioning and sexual behavior in the male albino rat*, Stockholm: Almqvist.
- Liu, Y. C., Salamone, J. D., and Sachs, B. D. (1997). Lesions in medial preoptic area and bed nucleus of stria terminalis: differential effects on copulatory behavior and noncontact erection in male rats. *J Neurosci* **17**(13), 5245-53.
- Lopez, H. H., Olster, D. H., and Ettenberg, A. (1999). Sexual motivation in the male rat: the role of primary incentives and copulatory experience. *Horm Behav* **36**(2), 176-85.

- Lydell, K., and Doty, R. L. (1972). Male rat of odor preferences for female urine as a function of sexual experience, urine age, and urine source. *Horm Behav* **3**(3), 205-12.
- Maillard-Gutekunst, C. A., and Edwards, D. A. (1994). Preoptic and subthalamic connections with the caudal brainstem are important for copulation in the male rat. *Behav Neurosci* **108**(4), 758-66.
- Maillard, C. A., and Edwards, D. A. (1991). Excitotoxin lesions of the zona incerta/lateral tegmentum continuum: effects on male sexual behavior in rats. *Behav Brain Res* **46**(2), 143-9.
- Marques, D. M., O'Connell, R. J., Benimoff, N., and Macrides, F. (1982). Delayed deficits in behavior after transection of the olfactory tracts in hamsters. *Physiol Behav* **28**(2), 353-65.
- Mas, M., Rodriguez del Castillo, A., Guerra, M., Davidson, J. M., and Battaner, E. (1987). Neurochemical correlates of male sexual behavior. *Physiol Behav* **41**(4), 341-5.
- Matsuoka, M., Yokosuka, M., Mori, Y., and Ichikawa, M. (1999). Specific expression pattern of Fos in the accessory olfactory bulb of male mice after exposure to soiled bedding of females. *Neurosci Res* **35**(3), 189-95.
- Meisel, R., and Sachs, B. D. (1994). The physiology of male sexual behavior. In E. K. J. Neill (Ed.), *The physiology of reproduction*, Vol. 2, pp. 3-105. Raven Press, Ltd, New York.
- Merari, A., and Ginton, A. (1975). Characteristics of exaggerated sexual behavior induced by electrical stimulation of the medial preoptic area in male rats. *Brain Res* **86**(1), 97-108.
- Meredith, M. (1986). Vomeronasal organ removal before sexual experience impairs male hamster mating behavior. *Physiol Behav* **36**(4), 737-43.
- Meredith, M. (1998a). Vomeronasal, olfactory, hormonal convergence in the brain. Cooperation or coincidence? *Ann N Y Acad Sci* **855**, 349-61.
- Morali, G., Asuncion Pia Soto, M., Luis Contreras, J., Arteaga, M., Gonzalez-Vidal, M. D., and Beyer, C. (2003). Detailed analysis of the male copulatory motor pattern in mammals: hormonal bases. *Scand J Psychol* **44**(3), 279-88.
- Mos, J., Van Logten, J., Bloetjes, K., and Olivier, B. (1991). The effects of idazoxan and 8-OH-DPAT on sexual behaviour and associated ultrasonic vocalizations in the rat. *Neurosci Biobehav Rev* **15**(4), 505-15.
- Mullen, R. J., Buck, C. R., and Smith, A. M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* **116**(1), 201-11.
- Murphy, A. Z., Rizvi, T. A., Ennis, M., and Shipley, M. T. (1999). The organization of preoptic-medullary circuits in the male rat: evidence for interconnectivity of neural structures involved in reproductive behavior, antinociception and cardiovascular regulation. *Neuroscience* **91**(3), 1103-16.
- Nemeth, H., Toldi, J., and Vecsei, L. (2005). Role of kynurenines in the central and peripheral nervous systems. *Curr Neurovasc Res* **2**(3), 249-60.
- Oboh, A. M., Paredes, R. G., and Baum, M. J. (1995). A sex comparison of increments in FOS immunoreactivity in forebrain neurons of gonadectomized, testosterone-treated rats after mounting an estrous female. *Neurobiol Learn Mem* **63**(1), 66-73.
- Okada, E., Aou, S., Takaki, A., Oomura, Y., and Hori, T. (1991). Electrical stimulation of male monkey's midbrain elicits components of sexual behavior. *Physiol Behav* **50**(1), 229-36.
- Pankevich, D. E., Baum, M. J., and Cherry, J. A. (2004). Olfactory sex discrimination persists, whereas the preference for urinary odorants from estrous females disappears in male mice after vomeronasal organ removal. *J Neurosci* **24**(42), 9451-7.
- Paredes, R., Haller, AE., Manero, MC., Alvarado R, and Agmo, A. (1990a). Medial preoptic area kindling induces sexual behavior in sexually inactive male rats. *Brain Res* **515**, 20-26.
- Paredes, R. G. (2003). Medial preoptic area/anterior hypothalamus and sexual motivation. *Scand J Psychol* **44**(3), 203-12.
- Paredes, R. G., and Agmo, A. (1992). Facilitation of sexual behavior shortly after electrolytic lesion of the medial preoptic area: what does it mean? *Brain Res Bull* **29**(1), 125-8.

- Paredes, R. G., and Agmo, A. (2004). Has dopamine a physiological role in the control of sexual behavior? A critical review of the evidence. *Prog Neurobiol* **73**(3), 179-226.
- Paredes, R. G., and Baum, M. J. (1995). Altered sexual partner preference in male ferrets given excitotoxic lesions of the preoptic area/anterior hypothalamus. *J Neurosci* **15**(10), 6619-30.
- Paredes, R. G., and Baum, M. J. (1997). Role of the medial preoptic area/anterior hypothalamus in the control of masculine sexual behavior. *Annu Rev Sex Res* **8**, 68-101.
- Paredes, R. G., Highland, L., and Karam, P. (1993a). Socio-sexual behavior in male rats after lesions of the medial preoptic area: evidence for reduced sexual motivation. *Brain Res* **618**(2), 271-6.
- Paredes, R. G., Lopez, M. E., and Baum, M. J. (1998). Testosterone augments neuronal Fos responses to estrous odors throughout the vomeronasal projection pathway of gonadectomized male and female rats. *Horm Behav* **33**(1), 48-57.
- Paredes, R. G., Pina, A. L., and Bermudez-Rattoni, F. (1993b). Hypothalamic but not cortical grafts induce recovery of sexual behavior and connectivity in medial preoptic area-lesioned rats. *Brain Res* **620**(2), 351-5.
- Paredes, R. G., Pina, A. L., Fernandez-Ruiz, J., and Bermudez-Rattoni, F. (1990b). Fetal brain transplants induce recovery of male sexual behavior in medial preoptic area-lesioned rats. *Brain Res* **523**(2), 331-6.
- Paredes, R. G., Tzschentke, T., and Nakach, N. (1998). Lesions of the medial preoptic area/anterior hypothalamus (MPOA/AH) modify partner preference in male rats. *Brain Res* **813**(1), 1-8.
- Paxinos, G. (1973). Midbrain and motivated behavior. *J Comp Physiol Psychol* **85**(1), 64-9.
- Paxinos, G., and Bindra, D. (1973). Hypothalamic and midbrain neural pathways involved in eating, drinking, irritability, aggression, and copulation in rats. *J Comp Physiol Psychol* **82**(1), 1-14.
- Paxinos, G., and Watson, C. (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 2nd ed, Sydney: Academic Press.
- Petralia, R. S., Yokotani, N., and Wenthold, R. J. (1994). Light and electron microscope distribution of the NMDA receptor subunit NMDAR1 in the rat nervous system using a selective anti-peptide antibody. *J Neurosci* **14**(2), 667-96.
- Pfaus, J. G. (1996). Frank A. Beach award. Homologies of animal and human sexual behaviors. *Horm Behav* **30**(3), 187-200.
- Pfaus, J. G. (1999). Revisiting the concept of sexual motivation. *Annu Rev Sex Res* **10**, 120-56.
- Portillo, W., Basanez, E., and Paredes, R. G. (2003). Permanent changes in sexual behavior induced by medial preoptic area kindling-like stimulation. *Brain Res* **961**(1), 10-4.
- Portillo, W., and Paredes, R. G. (2004). Sexual incentive motivation, olfactory preference, and activation of the vomeronasal projection pathway by sexually relevant cues in non-copulating and naive male rats. *Horm Behav* **46**(3), 330-40.
- Putnam, S. K., Du, J., Sato, S., and Hull, E. M. (2001). Testosterone restoration of copulatory behavior correlates with medial preoptic dopamine release in castrated male rats. *Horm Behav* **39**(3), 216-24.
- Retana-Márquez, S., and Velázquez-Moctezuma, J. (1995). Regulación colinérgica de la conducta sexual. In S. a. V.-M. Retana-Marquez, J. (Ed.), *Temas seletos de neurociencias.*, pp. 487-509, México.
- Rios, C., and Santamaria, A. (1991). Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates. *Neurochem Res* **16**(10), 1139-43.
- Rizvi, T. A., Murphy, A. Z., Ennis, M., Aston-Jones, G., and Shipley, M. T. (1998). Fos expression in rat pontine tegmental neurons following activation of the medial preoptic area. *Brain Res* **789**(2), 256-62.
- Rizvi, T. A., Murphy, A. Z., Ennis, M., Behbehani, M. M., and Shipley, M. T. (1996). Medial preoptic area afferents to periaqueductal gray medullo-output neurons: a combined Fos and tract tracing study. *J Neurosci* **16**(1), 333-44.

- Sachs, B. D. (1997). Erection evoked in male rats by airborne scent from estrous females. *Physiol Behav* **62**(4), 921-4.
- Sachs, B. D., and Barfield, R. J. (1976). Functional analysis of masculine copulatory behavior in the rat. . In R. A. H. J. S. Rosenblatt, E. Shaw & C. Beer. (Ed.), *Advances in the study of behavior* Vol. 7, pp. 91-154. Academic Press, New York.
- Sandkuhler, J., and Gebhart, G. F. (1991). Production of reversible local blockage of neuronal function. In P. Conn (Ed.), *Lesions and transplantation*, Vol. 7, pp. 122-138. Academic Press, Inc, San Diego, California.
- Scalia, F., and Winans, S. S. (1975). The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J Comp Neurol* **161**(1), 31-55.
- Sequeira, H., Poulain, P., Ba-M'Hamed, S., and Viltart, O. (2000). Immunocytochemical detection of fos protein combined with anterograde tract-tracing using biotinylated dextran. *Brain Res Brain Res Protoc* **5**(1), 49-56.
- Shimura, T., and Shimokochi, M. (1990). Involvement of the lateral mesencephalic tegmentum in copulatory behavior of male rats: neuron activity in freely moving animals. *Neurosci Res* **9**(3), 173-83.
- Shimura, T., Yamamoto, T., and Shimokochi, M. (1994). The medial preoptic area is involved in both sexual arousal and performance in male rats: re-evaluation of neuron activity in freely moving animals. *Brain Res* **640**(1-2), 215-22.
- Simerly, R. B., and Swanson, L. W. (1988). Projections of the medial preoptic nucleus: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin anterograde tract-tracing study in the rat. *J Comp Neurol* **270**(2), 209-42.
- Sirinathsingji, D. J. S. (1991). Lesioning of rat nigrostriatal dopamine pathway with 1-methyl-4-phephenylpyridinium ion (MPP+). In P. Conn (Ed.), *Lesions and transplantation*, Vol. 7, pp. 3-15. Academic Press, Inc, San Diego, California.
- Stern, J. J. (1970). Responses of male rats to sex odors. *Physiol Behav* **5**(4), 519-24.
- Swann, J. M., Wang, J., and Govek, E. K. (2003). The MPN mag: introducing a critical area mediating pheromonal and hormonal regulation of male sexual behavior. *Ann N Y Acad Sci* **1007**, 199-210.
- Swanson, L. W. (2003). The motor system, *Brain architecture*, pp. 97-138. Oxford University Press, New York.
- Swanson, L. W., Kucharczyk, J., and Mogenson, G. J. (1978). Autoradiographic evidence for pathways from the medial preoptic area to the midbrain involved in the drinking response to angiotensin II. *J Comp Neurol* **178**(4), 645-59.
- Szechtman, H., Caggiula, A. R., and Wulkan, D. (1978). Preoptic knife cuts and sexual behavior in male rats. *Brain Res* **150**(3), 569-95.
- Truitt, W. A., and Coolen, L. M. (2002). Identification of a potential ejaculation generator in the spinal cord. *Science* **297**(5586), 1566-9.
- Van De Poll, N. E., and Van Dis, H. (1979). The effect of medial preoptic--anterior hypothalamic lesions on bisexual behavior of the male rat. *Brain Res Bull* **4**(4), 505-11.
- Van Furth, W. R., and Van Ree, J. M. (1996). Appetitive sexual behavior in male rats: 1. The role of olfaction in level-changing behavior. *Physiol Behav* **60**(3), 999-1005.
- Veening, J. G., and Coolen, L. M. (1998). Neural activation following sexual behavior in the male and female rat brain. *Behav Brain Res* **92**(2), 181-93.
- Vuillon-Cacciuttolo, G., Bosler, O., and Nieoullon, A. (1986). Immunohistochemical evidence of plasticity of gamma-aminobutyric acid neurons in the red nucleus and adjacent reticular formation after contralateral cerebellectomy in the adult cat. *Neurosci Lett* **70**(3), 308-13.
- Wersinger, S. R., Baum, M. J., and Erskine, M. S. (1993). Mating-induced FOS-like immunoreactivity in the rat forebrain: a sex comparison and a dimorphic effect of pelvic nerve transection. *J Neuroendocrinol* **5**(5), 557-68.

- Winans, S. S., and Powers, J. B. (1977). Olfactory and vomeronasal deafferentation of male hamsters: histological and behavioral analyses. *Brain Res* **126**(2), 325-44.
- Winn, P. (1991). Excitotoxins as tools for producing brain lesions. In P. Conn (Ed.), *Lesions and transplantation*, Vol. 7, pp. 16-27. Academic Press, Inc, San Diego, California.
- Yells, D. P., Hendricks, S. E., and Prendergast, M. A. (1992). Lesions of the nucleus paragigantocellularis: effects on mating behavior in male rats. *Brain Res* **596**(1-2), 73-9.
- Yoon, H., Enquist, L. W., and Dulac, C. (2005). Olfactory inputs to hypothalamic neurons controlling reproduction and fertility. *Cell* **123**(4), 669-82.