



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**RATAS MACHO NORMALES Y RÁPIDAS EN COMPETENCIA:
CONSECUENCIAS EN LA CONDUCTA Y EL EYACULADO
DURANTE LA CÓPULA REGULADA POR LA HEMBRA**

TESIS

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

PRESENTA:

MARIA REYNA FUENTES MORALES

**DRA. ROSA ANGÉLICA LUCIO LUCIO,
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA, UATx**

**DR. GABRIEL GUTIÉRREZ-OSPINA,
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

**DR. JOSÉ ALONSO FERNÁNDEZ GUAISTI,
CINVESTAV-SUR, IPN**

**DR. GABRIEL ROLDÁN ROLDÁN,
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**



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.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
OFICIO CPCB/255/2021
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 28 de septiembre de 2020 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **FUENTES MORALES MARÍA REYNA** con número de cuenta **51502589-5** con la tesis titulada **“Ratas macho normales y rápidas en competencia: consecuencias en la conducta y el eyaculado durante la cópula regulada por la hembra”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. ROSA ANGÉLICA LUCIO LUCIO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. LAURA ROXANA TORRES AVILÉS
Vocal: DR. CARLOS RAFAEL CORDERO MACEDO
Vocal: DR. JOSÉ RAMÓN EGUIBAR CUENCA
Vocal: DR. ALEJANDRO CÓRDOBA AGUILAR
Secretario: DR. GABRIEL ROLDÁN ROLDÁN

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 25 de marzo de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por el apoyo que me brindó para realizar mis estudios de doctorado. Para mí, fue un honor formar parte de tan prestigiado posgrado. Especialmente, quiero agradecer a la Dra. Maria de Coro Arizmendi y al Dr. Adolfo Gerardo Navarro Sigüenza, a Lilia Espinosa, a Patricia Oliva Estrella y a Erica Flores Téllez, por sus oportunas asesorías en los diversos ámbitos administrativos del Posgrado. Gracias a todos por su apoyo ya que siempre recibí la información oportuna de cada uno de ustedes.

El presente proyecto de investigación fue posible gracias a diferentes apoyos económicos recibidos. Agradezco a CONACYT por otorgarme una beca para estudios de posgrado (400424, M.R.F.M.), así como autorizar el proyecto número 105502 a R.A.L. Además, agradezco el apoyo del proyecto DGAPA-PAPIIT-UNAM número IN215208 otorgado a G.G.O y R.A.L.

Finalmente, agradezco a la Dra. Rosa Angélica Lucio Lucio, mi Tutor Principal, así como al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina por llevar bajo su co-dirección esta tesis. Igualmente, agradezco los comentarios y sugerencias del Dr. José Alonso Fernández Guasti y del Dr. Gabriel Roldán Roldán, miembros del comité tutor, para la realización de la presente tesis.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A mi Tutora Principal, la Dra. Rosa Angélica Lucio Lucio, por su apoyo, esfuerzo, tiempo, dedicación y paciencia que mostró durante la realización de esta tesis. También le agradezco el haberme brindado su conocimiento a manos llenas e impulsarme a continuar en el camino de la ciencia que tanto me apasiona. Personalmente, agradezco la confianza que depositó en mí y la amistad que me ha brindado durante diez años, desde que llegué a su laboratorio. Gracias por ayudarme a cumplir una meta más, que aunque se tornó un poco complicada por varias situaciones profesionales, personales y sociales que ocurrieron en el transcurso, pero con su apoyo las superamos. En este proyecto usted me ha guiado, no ha sido fácil, sin embargo, con su ayuda ha sido menos complicado. ¡Sinceramente, muchas gracias!

Al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, co-tutor de esta tesis, por su apoyo, enseñanzas y conocimientos compartidos para la realización de este trabajo de investigación. Además, reconozco las ideas geniales que aportó para mejorar este proyecto. Asimismo, le agradezco sus acertados comentarios y crítica constructiva para pensar más allá de lo establecido en la ciencia. Finalmente le agradezco por el entusiasmo y optimismo que siempre mostró cuando obteníamos los resultados de los experimentos.

A los miembros de mi Comité Tutorial:

Al Dr. José Alonso Fernández Guasti por su inestimable ayuda intelectual y sus valiosas sugerencias para la realización de este proyecto. Por su apoyo durante el examen predoctoral y siempre estar al pendiente de mis avances y cuando le solicitábamos apoyo. Le agradezco por el interés mostrado en este proyecto de investigación. Y sobre todo le doy gracias por la humildad y apoyo humano que siempre me hizo sentir en confianza y ser tomada en cuenta.

Al Dr. Gabriel Roldán Roldán, por su colaboración y grandes aportaciones que enriquecieron el trabajo de investigación de esta tesis. Además, reconozco su disposición de apoyarme siempre en cualquier tema relacionado con el proyecto. Asimismo, agradezco el interés y entusiasmo mostrado durante este proyecto de investigación. Finalmente, reconozco la amabilidad con la que siempre me guio para mejorar el trabajo.

A los miembros del jurado de examen de grado por sus valiosos consejos y sugerencias para mejorar esta tesis: Dra. Laura Roxana Torres Avilés, Dr. Carlos Rafael Cordero Macedo, Dr. José Ramón Eguibar Cuenca y Dr. Alejandro Córdoba Aguilar.

A todos los profesores de la UNAM y de la Universidad Autónoma de Tlaxcala que me compartieron un poco de su experiencia.

A todas las personas de la Administración, Biblioteca, Recepción y Bioterio de la UNAM y del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, por todo su apoyo. A Adriana López, Mayra Ocegüera y Jaime Madrid de la UNAM, por su apoyo administrativo y sobre todo por la confianza y amabilidad que me brindaron en estos años.

A mis amigos Vero Rodríguez y Carlos Aguilar, por su amistad, compañerismo, por las aventuras compartidas y sus buenos consejos. ¡Muchas gracias!

A mis compañeros del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta con los que compartí momentos y pláticas agradables.

DEDICATORIA

Esta tesis la dedico a mi padre, el señor Gabriel Fuentes Alonso, que a pesar de que ya no se encuentra físicamente conmigo, guardo un enorme cariño y amor por la persona que me enseñó muchas cosas, entre ellas que el trabajo y el esfuerzo constante te llevan a cumplir tus metas. Eres un ejemplo a seguir, en todos los aspectos de mi vida. Tú me apoyaste y me viste iniciar este nuevo proyecto y compartiste conmigo la alegría que sentí al pertenecer a la UNAM, una meta que desde hace tiempo quería realizar. Aún había cosas que quería compartir contigo y que no fue posible, como llegar al momento donde culminara este proyecto importante de mi vida. Por ello te dedico el trabajo y empeño que puse en este proyecto y te dedico estas palabras con todo el cariño que guardo para ti. Un día comentaste que lo único que podrías dejarme era una carrera y así me diste la oportunidad de tener un título universitario, el resto del camino lo seguí por mi gusto y mi pasión por la ciencia.

¡Gracias porque sin tu apoyo no lo habría logrado!

También quiero agradecer a mi madre, Cristina Morales Hernández por el amor y cariño que me ha demostrado y que me impulsa a cumplir una meta más. Por enseñarme su fortaleza ante las adversidades, gracias por ser una mujer fuerte y trabajadora. Te agradezco infinitamente el haberme ayudado con Gael durante mis estudios de doctorado, sin tu apoyo, hubiera sido más complicado terminar este proyecto.

Esta tesis también la dedico a Gerardo y a Gael por enseñarme el valor de la familia. Ustedes también forman parte de este proyecto. Gera, apoyándome desde hace años, para continuar y culminar con mis estudios y ser mi cómplice en perseguir mis metas personales y profesionales. Gael por ser un niño muy comprensivo para su edad y llenándome de cariño, besos, abrazos y más motivos para seguir cumpliendo mis objetivos. Ambos, me enseñan que cuando las situaciones parecen ponerse complicadas, con amor, esfuerzo y unión las cosas son posibles.

¡Gracias por darme alegría y felicidad y por llegar a mi vida en el momento indicado!

A mis hermanos Oly y May, por los momentos de unión que compartimos en familia y por el cariño que recibo de ellos. Ustedes y mamá fueron mi apoyo en los momentos más complicados que pasamos.

A mi familia y personas que me apoyaron para que mi ingreso a la UNAM fuera posible. A mi prima Luz y a la familia Badillo-Fuentes de Izúcar de matamoros, Puebla y de Ixtapaluca, estado de México, por brindarme asilo y confianza.

A toda mi familia paterna y materna por estar ahí cuando más los necesitamos.

A la vida, porque me dio una segunda oportunidad, para cumplir otro de mis objetivos.

Sé el cambio que quieres ver en el mundo.

Mahatma Gandhi

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Competencia espermática	5
1.2 Modelos teóricos de competencia	6
1.2.1 Modelo de riesgo de competencia espermática	6
1.2.2 Modelo de intensidad de competencia espermática	8
1.3 Conducta copulatoria y fenotipos copulatorios de la rata macho	11
1.4 Eyaculado de la rata macho	14
1.5 Conducta copulatoria de la rata hembra.....	16
1.5.1 Cópula regulada por la rata hembra.....	17
2. HIPÓTESIS	21
2.1 Predicciones	21
3. OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo General	22
3.2 Objetivos Específicos.....	22
4. ANTECEDENTES	23
4.1 Consecuencias de la presencia de rivales sobre la cópula y el eyaculado de la rata macho	23
4.2 Consecuencias de la presencia de rivales sobre la cópula y el eyaculado de machos normales y rápidos	24
4.2.1 Fenotipos copulatorios y el eyaculado.....	24
4.2.2 Competencia entre machos considerando el fenotipo copulatorio: efectos sobre la cópula y el eyaculado	24
5. METODOLOGÍA	27
5.1 Animales	27
5.2 Entrenamiento copulatorio.....	27
5.3 Análisis de la cópula sin-competencia y con-competencia.....	29
5.3.1 Parámetros copulatorios	30
5.4 Análisis del eyaculado	30
5.4.1 Obtención del fluido uterino y tapón seminal	30
5.4.2 Parámetros seminales	31

5.4.3	Parámetros del tapón seminal	34
5.5	Identificación de fenotipos eyaculatorios	34
5.6	Entrenamiento femenino para pruebas de habituación de cópula regulada	35
5.7	Cópulas sin-competencia masculina <i>versus</i> cópulas con-competencia masculina cuando la hembra regula	35
5.8	Análisis estadístico.....	37
6.	RESULTADOS	38
6.1	Consecuencias de la presencia de un rival sobre la cópula y el eyaculado de la rata macho cuando la hembra regula	38
6.1.1	Fenotipos copulatorios y eyaculado cuando la hembra regula	38
6.1.2	Competencia entre machos considerando el fenotipo copulatorio cuando la hembra regula: efectos sobre la cópula y el eyaculado	39
7.	DISCUSIÓN	44
7.1	Los fenotipos eyaculatorios se mantienen cuando no existe competencia y la hembra regula la cópula	44
7.2	El eyaculado de los machos de fenotipo rápido y normal no cambia en las cópulas sin competencia cuando la hembra regula la cópula	46
7.3	Los machos rápidos alargan la latencia eyaculatoria durante la competencia; los machos normales no, cuando la hembra regula la cópula.....	47
7.4	La cuenta espermática no cambia por la competencia entre machos rápidos ni entre machos normales cuando la hembra regula	48
7.5	La movilidad espermática de machos rápidos y machos normales disminuye drásticamente por la competencia cuando la hembra regula	49
8.	CONCLUSIONES	54
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
10.	ANEXOS	65
10.1	Identificación de fenotipos eyaculatorios	65
10.1.1	Machos de fenotipo copulatorio rápido	67
10.1.2	Machos de fenotipo copulatorio normal	70
10.2	Hoja de registro de la conducta sexual masculina	73
11.	ARTÍCULOS Y CAPÍTULOS PUBLICADOS	74

RESUMEN

En condiciones naturales, la cópula con múltiples parejas sexuales es un evento común para machos y hembras de diversas especies.

Por lo tanto, es frecuente que los espermatozoides de distintos machos se encuentren al mismo tiempo en el tracto reproductor femenino compitiendo por fertilizar a los óvulos, propiciando de este modo, la competencia espermática. Tanto la competencia entre los machos como entre los espermatozoides han promovido la evolución de estrategias reproductivas masculinas que incrementan la posibilidad de ser el padre de más y mejores crías. La teoría de la competencia espermática propone que los machos ajustan el número de espermatozoides que transfieren en el eyaculado dependiendo del riesgo o la intensidad de la competencia. El modelo teórico de intensidad de competencia espermática predice que cuando existe solamente un rival, los machos deberían incrementar el gasto del eyaculado; mientras que, si el número de machos que compiten supera a dos, reducirían el número de espermatozoides eyaculados. Este modelo teórico se enfoca exclusivamente en el número espermático, nada predice sobre otros parámetros seminales también importantes para la calidad del eyaculado. El modelo tampoco vaticina las consecuencias de la competencia entre machos en el despliegue conductual copulatorio. Interesantemente, se sabe que la competencia entre ratas machos disminuye significativamente el número de intromisiones, el intervalo inter-intromisión y la latencia de eyaculación, en condiciones de laboratorio. Por el contrario, en condiciones semi-naturales, la competencia masculina incrementa el intervalo inter-intromisión y el intervalo post-eyaculatorio. Sólo un estudio, en la rata de laboratorio, ha mostrado que los machos incrementan el número de espermatozoides eyaculados cuando copulan en la presencia de un rival sin que exista contacto físico entre los competidores.

Actualmente, se conoce que existen fenotipos copulatorios (rápido, normal y lento) tanto en las ratas macho como en los hombres. Nuestro grupo de investigación ha mostrado que la competencia entre dos rivales de fenotipo rápido o dos de fenotipo normal, tiene consecuencias sobre la cópula y el eyaculado dependiendo del fenotipo copulatorio. Sólo los machos rápidos disminuyen la latencia de eyaculación, número de intromisiones e intervalo inter-intromisión. Además, incrementan el número de espermatozoides eyaculados. En ambos fenotipos, se produce un efecto negativo de la competencia sobre la movilidad espermática progresiva porque ésta disminuye drásticamente.

El comportamiento copulatorio de los roedores ha sido estudiado, desde sus inicios en la década de los 50's, en condiciones que propician el control de la interacción sexual por el macho. Fue hasta los 70's cuando empezó a evidenciarse que las ratas hembra también pueden controlar el ritmo copulatorio o "pacing". La cópula regulada permite que la hembra controle la estimulación vagino-cervical provista por las montas, intromisiones y eyaculaciones. Y se dice que es una actividad innata y estable del comportamiento sexual femenino y sucede en condiciones naturales, semi-naturales o de laboratorio.

El objetivo del presente estudio fue evaluar las consecuencias que tiene la competencia entre dos machos, del mismo o diferente fenotipo, sobre la conducta copulatoria y el eyaculado cuando la hembra regula la cópula. Se utilizaron ratas Wistar maduras sexualmente, los machos sexualmente expertos se identificaron según su fenotipo copulatorio y a las hembras ovariectomizadas se les indujo hormonalmente el estro. Los machos de fenotipo eyaculatorio rápido y los de fenotipo normal fueron analizados en dos contextos copulatorios: no-competencia (un macho-una hembra) y en competencia (dos machos- una hembra), en ambos casos la cópula fue regulada por la hembra. Las competencias fueron entre dos machos rápidos

(R *versus* R) y entre dos machos normales (N *versus* N). La prueba terminó cuando uno de los dos eyaculó. Las pruebas conductuales fueron videograbadas y se registraron los parámetros copulatorios y seminales.

Los resultados indican que los machos rápidos que eyacularon durante la competencia con cópula regulada incrementaron significativamente la latencia de eyaculación e intervalo inter-intromisión hasta valores cercanos a los de los machos normales. Por el contrario, los machos normales durante la competencia con cópula regulada no modificaron la latencia de eyaculación, número de montas e intromisiones ni el intervalo inter-intromisión. Dado que en competencia, los machos rápidos se comportan como los machos normales y éstos no modifican sus parámetros es probable que el ritmo copulatorio del macho normal sea el adecuado para proporcionar a la hembra, la estimulación sexual que necesita e inducir la gestación.

La cuenta espermática fue similar en ambos contextos copulatorios (no-competencia y competencia), independientemente del fenotipo del macho. Es probable que los machos rápidos no expulsen más espermatozoides durante la competencia con cópula regulada por la hembra quizá porque infieren que la hembra no regrese a copular o que podría copular con otros rivales. De ese modo, sería un gasto innecesario porque la probabilidad de engendrar descendencia es menor. También es probable que existan mecanismos fisiológicos internos que la hembra puede echar a andar para regular el número o el paso de espermatozoides de cada macho y con ello pone en igualdad de condiciones a los machos rápidos y normales en competencia para que sea fecundada por los mejores espermatozoides.

La movilidad espermática progresiva disminuyó significativamente durante la competencia con cópula regulada, independientemente del fenotipo del macho. La competencia es la principal causa del decremento en la movilidad espermática. Este efecto podría deberse a que el macho rival secreta algunas sustancias que impiden la movilidad espermática. Otra explicación podría ser que la competencia genere estrés en los machos y esto repercuta en la disminución de la movilidad espermática. También podría ser que la hembra influya sobre los espermatozoides que se albergan en su tracto reproductivo (selección críptica), por lo que probablemente secreten compuestos químicos que inmovilicen temporalmente a los espermatozoides o que favorezcan la movilidad espermática después de un tiempo. Es probable que el ambiente intrauterino sea agente de cambio de la movilidad del espermatozoide. Se sugiere que la pérdida de movilidad espermática es un efecto momentáneo. Estudios futuros deberían evaluar la movilidad espermática después de varios minutos, incluso hasta horas posteriores a la eyaculación para verificar tal hipótesis. No se descarta que la hembra cuando regula la cópula, pueda tener un efecto positivo sobre la movilidad espermática. Así, es posible que la rata hembra, al regular la cópula obtiene mayor estimulación sexual, favoreciendo la secreción de algunas moléculas en el fluido uterino que favorezcan la movilidad espermática progresiva. Es posible que este tipo de mecanismos le confieran a la rata hembra un tipo de control sobre cuáles espermatozoides utilizar para la fertilización. Estudios futuros necesitan realizarse para saber qué tipo de mecanismos crípticos regulan tales condiciones. Los presentes resultados sugieren que la hembra, al regular la cópula, permite la igualdad de condiciones copulatorias y del eyaculado a los machos rápidos y normales, de tal forma que sea una competencia y de esa forma seleccionar a los mejores espermatozoides, lo que incrementaría su éxito reproductivo.

ABSTRACT

Under natural conditions, intercourse with multiple sexual partners is a common event for males and females of various species, consequently males compete for females. Therefore, it is common for sperm from different males overlap in the female reproductive tract and competing to fertilize the eggs, thus promoting sperm competition. Both male-male competition and sperm competition have promoted the evolution of male reproductive strategies that increase the possibility of being the father of more and better offspring. Sperm competition theory proposes that males alter the number of sperm they inseminate according to variations in the risk or intensity of competition. The theoretical sperm competition intensity model predicts that when there is only one rival, males should increase ejaculate expenditure; but if the number of competing males increase to two, they would reduce the number of ejaculated sperm. This model focuses exclusively on the spermatozoa number, nothing predicts on other seminal parameters also important for the quality of the ejaculate. The model does not predict the consequences of male-male competition on copulatory behavioral display. Interestingly, competition between male rats is known to decrease the number of intromissions, inter-intromission interval, and ejaculation latency, under laboratory conditions. In contrast, under semi-natural conditions, male-male competition increases the inter-intromission interval and the post-ejaculatory interval. Only one study, in the laboratory rat, has shown that males increase the number of spermatozoa expelled when they copulate in the presence of a rival without physical contact between competitors.

Currently, copulatory phenotypes (rapid, normal, and sluggish) exist in male rats and mens. Our research group has shown that competition between two fast rivals or two normal, has consequences on copulatory behavior and characteristics of ejaculate depending on the phenotype. Only rapid males decrease ejaculation latency, number of intromissions and inter-intromission interval. In addition, they increase the number of spermatozoa expelled. In both phenotypes, there is a negative effect of competition on progressive sperm mobility because it decreases dramatically.

The copulatory behavior of rodents has been studied, since its inception in the 1950s, under conditions that favor the control of sexual interaction by the male. It was not until the 70's when it became evident that female rats can also control the copulatory rhythm or “pacing”. Pacing allows the female to control the vaginal-cervical stimulation provided by the mounts, intromissions and ejaculations. Pacing is an innate and stable activity of female sexual behavior and occurs in natural, semi-natural or laboratory conditions.

The aim of the present study was to evaluate the consequences of male-male competition between two males, of the same or different phenotype, on copulation and ejaculation behaviour when the female regulates copulation. Sexually mature Wistar rats were used, sexually expert males were identified according to their copulatory phenotype, and ovariectomized females were hormonally induced for oestrus. Males of rapid and normal ejaculatory phenotype were analyzed in two copulatory contexts: non-competitive (one male-one female) and competitive (two males-one female), in both cases the female regulates the copulation. Competition was between two rapid or two normal males (*R versus R* or *N versus N*). The test ended when one of the two males ejaculated. Behavioral tests were videotaped and copulatory and seminal parameters were recorded.

The results indicate that rapid males that ejaculated during competition with “pacing”, significantly increased ejaculation latency and inter-intromission interval to similar values to those of normal males. On the contrary, normal males during the competition with “pacing”,

mating did not modify the ejaculation latency, number of mounts and intromissions or the inter-intromission interval. Since in competition, rapid males behave like normal males and the latter do not modify their parameters, it is probably that the copulatory rhythm of the normal male is adequate to provide the female with the sexual stimulation she needs to induce gestation.

The sperm count was similar in both copulatory contexts (non-competition and competition), regardless of the male's phenotype. It is likely that rapid males do not expel more sperm during competition with "pacing" because they infer that the female does not return to copulate or that she could copulate with other rivals. This would be an unnecessary expense because the probability of generating offspring is lower. It is also likely that there are internal physiological mechanisms that the female can activate to regulate the number or passage of sperm from each male. So, the female put on an equal conditions to the rapid and normal males to be fertilized by the best sperm.

Progressive sperm motility decreased significantly during competition with "pacing", regardless of the male's phenotype. Male-male competition is the main cause of the decrease in sperm motility. This effect could be due to the rival male secreting some substances that prevent sperm mobility. Another explanation could be that competition produce stress in males and this has an impact on decreased sperm mobility. It could also be that the female influences the spermatozoa that are hosted in her reproductive tract (cryptic selection), so they probably secrete chemical compounds that temporarily immobilize the spermatozoa or that increase sperm mobility after a minutes or hours. The intrauterine environment is likely to be an agent of change in sperm motility. It is suggested that the decrement in sperm motility is a momentary effect. Future studies should evaluate sperm motility after 15, 20, 30, 40, 60 or more hours to verify this hypothesis. It is not excluded that "pacing" may have a positive effect on sperm motility. Thus, it is possible that during "pacing" the female rat obtains greater sexual stimulation, promoting the secretion of some molecules in the uterine fluid that favour progressive sperm mobility. It is possible that this type of mechanism gives the female rat a type of control over which spermatozoa to use for fertilization. Future studies need to be done to find out what kind of cryptic mechanisms regulate such conditions. The present results suggest that the "pacing" allows equal copulatory and ejaculatory conditions to normal and rapid males, so that it is a competition and thus select the best spermatozoa, which would increase their reproductive success.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Competencia espermática

En condiciones naturales, las hembras y los machos de diversas especies de mamíferos se aparean con muchas parejas en el mismo periodo reproductivo (Calhoun 1963, Gomendio *et al.* 1998 en Birkhead y Moller 1998, Endries y Adler 2005). La cópula con múltiples parejas tiene como consecuencia que los machos compitan por las hembras (Darwin 1871 en Birkhead y Moller 1998).

La competencia entre machos ha promovido la evolución de diferentes estrategias reproductivas masculinas que incrementan la posibilidad de ser el padre de más y mejores crías. Entre las estrategias copulatorias masculinas ha de citarse el apareamiento repetido comúnmente con distintas hembras (Gomendio *et al.* 1998); y entre las estrategias fisiológicas, aquellas que regulan el gasto del eyaculado (número de espermatozoides eyaculados; Parker 1998).

Parker (1970) sugirió que además de la competencia por ser el más fuerte o atractivo, también existe la competencia entre los espermatozoides de diferentes machos. La competencia espermática se define como la presencia simultánea de espermatozoides vivos de dos o más machos dentro de los conductos femeninos conteniendo para fertilizar a los óvulos (Parker 1970). Una de las predicciones de la teoría de la competencia espermática es que los machos ajustan el número de espermatozoides que depositan en la hembra dependiendo del riesgo o de la intensidad de la competencia espermática, a esta estrategia se le llama asignación espermática estratégica prudente (Parker 1970, 1982). En especies con alto riesgo o intensidad de competencia espermática, los machos producen y expulsan más espermatozoides, lo que les confiere más ventajas reproductivas porque a mayor cantidad de espermatozoides, mayor es la probabilidad de fertilización (Moller 1989, Birkhead y Moller 1998). De este modo, la

competencia espermática es una fuerza selectiva poderosa que ha moldeado no solo el comportamiento reproductivo sino también, la morfología y fisiología del aparato reproductor, así como, el fenotipo de los gametos masculinos (Birkhead y Moller 1998). Se han propuesto diferentes modelos teóricos que predicen los efectos de la competencia masculina sobre el gasto espermático (número de espermatozoides eyaculados). Estos modelos consideran importante el nivel de información que tienen los machos sobre el contexto copulatorio y sus rivales para así ajustar estratégicamente el gasto del eyaculado. Así, existe el modelo del riesgo e intensidad de competencia espermática, el modelo del macho favorecido y desfavorecido, el modelo con información asimétrica, entre otros (Parker 1998).

1.2 Modelos teóricos de competencia

1.2.1 Modelo de riesgo de competencia espermática

El modelo teórico de riesgo de competencia espermática se refiere a las presiones selectivas que resultan de la probabilidad de que la hembra haya copulado previamente o que copulará con otro macho (Parker *et al.* 1997). Así, los machos podrían inferir el riesgo de competencia utilizando señales olfativas, táctiles, auditivas y/o visuales (Pound y Gage 2004). Este modelo vaticina que cuando el riesgo de competencia espermática es bajo, los machos disminuyen el gasto espermático, es decir, eyaculan menos espermatozoides. Sin embargo, cuando evalúan que el riesgo es alto, incrementan el número de espermatozoides eyaculados (Parker *et al.* 1997, **Figura 1A**).

Dicha predicción sobre el incremento espermático ha sido ampliamente comprobada por los ecólogos en numerosas especies de invertebrados, particularmente en insectos [escarabajo de la harina (*Tenebrio molitor*), la mosca de la fruta Mediterránea (*Ceratitis capitata*),

saltamontes (*Requena verticalis*), mariposa (*Pieris rapae*) y en la polilla de la harina (*Plodia interpunctella*); Gage y Baker 1991, Gage 1991, Simmons *et al.* 1993, Wedell y Cook 1999, Gage 1995)]. En los vertebrados, específicamente en mamíferos, las evidencias son escasas. Se ha mostrado que el ratón de campo (*Microtus pennsylvanicus*) y el topillo rojo (*Myodes glareolus*) incrementan el número de espermatozoides cuando copulan en presencia de olores de rivales (del Barco-Trillo y Ferkin 2004, Lemaitre *et al.* 2011). El ratón doméstico (*Mus musculus*) también ajusta la producción espermática de acuerdo con el riesgo de competencia espermática. La producción espermática testicular y la cuenta espermática en la cauda epididimaria son más altas en sujetos enfrentados con rivales o expuestos a sus olores (Ramm y Stockley 2009, Ramm *et al.* 2015). Asimismo, se incrementa el número de espermatozoides eyaculados cuando el riesgo de competencia espermática es alto en la rata (*Rattus norvegicus*; Bellis *et al.* 1990, Pound y Gage 2004).

La mayoría de los estudios tanto en invertebrados como en vertebrados se han enfocado en evaluar los efectos de la competencia espermática sobre el número espermático, omitiendo la movilidad, morfología y viabilidad espermáticas, características que también son importantes considerarlas para la calidad del eyaculado. Además, tampoco han considerado el papel de los componentes no espermáticos del eyaculado como el tapón copulatorio en la competencia masculina. En roedores, las secreciones que conforman el eyaculado participan en la formación del tapón copulatorio, se dice que éste representa una adaptación defensiva ante la competencia (Voss 1979, Dewsbury 1988).

Por otra parte, el modelo de riesgo de competencia espermática no contempla que la competencia masculina durante el apareamiento puede incidir en el desempeño del despliegue de la conducta copulatoria de los machos. Sólo un estudio ha mostrado que el riesgo de competencia provoca la eyaculación prematura, es decir, que acorta la duración de la cópula, al

reducir el número de patrones copulatorios. Los estímulos visuales, olfativos y/o auditivos del macho rival, aunque no su presencia, acortan la latencia eyaculatoria en el ratón doméstico (Preston y Stockley 2006).

1.2.2 Modelo de intensidad de competencia espermática

El modelo teórico de intensidad de competencia espermática se refiere a las presiones selectivas que resultan de que la hembra copula con varios machos provocando que los eyaculados de distintos machos rivales entren en competencia. El modelo teórico predice que los machos ajustan el gasto del eyaculado de acuerdo con el número de rivales presentes en el momento de la cópula. Así, a mayor número de rivales, mayor gasto del eyaculado (Parker y Begon 1993, Wedell *et al.* 2002, **Figura 1B**). Este modelo fue propuesto para estudiar la competencia espermática considerando que los machos no tienen o tienen poca información del número de rivales copulatorios. Así, la estrategia eyaculatoria utilizada por esos machos es moldeada por la selección natural (Parker 1998).

A) MODELO DEL RIESGO

B) MODELO DE LA INTENSIDAD

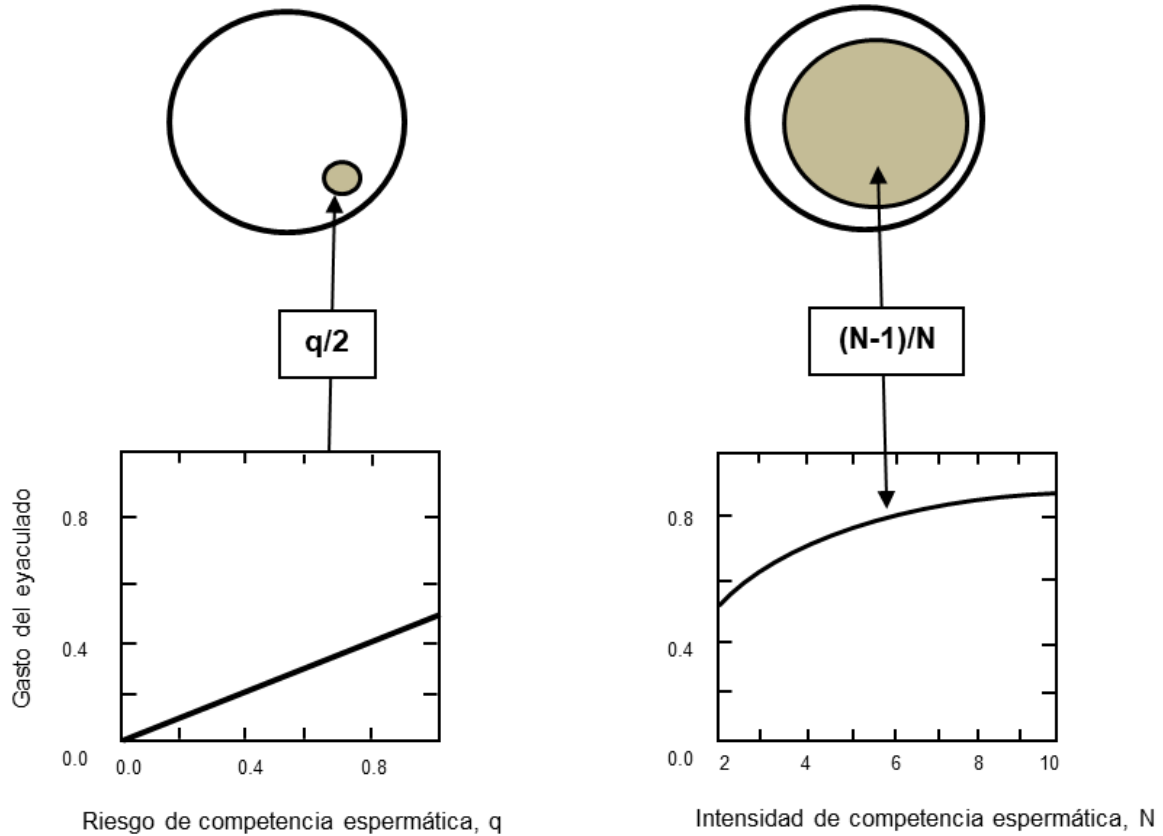


Figura 1. Modelos teóricos del riesgo e intensidad de competencia espermática. **A)** Cuando el riesgo (q = probabilidad de doble cópula) y **B)** la intensidad de competencia espermática (N = número de rivales o de eyaculados que compiten) aumentan, los machos incrementan el número de espermatozoides eyaculados (modificado de Parker *et al.* 1996.).

Otra variante del modelo teórico de intensidad de competencia espermática considera que los machos pueden estimar el número de rivales presentes durante la cópula. Así, el modelo sugiere que los machos deberían disminuir el gasto del eyaculado conforme el número de rivales incrementa por encima de dos (**Figura 2**, Parker 1998).

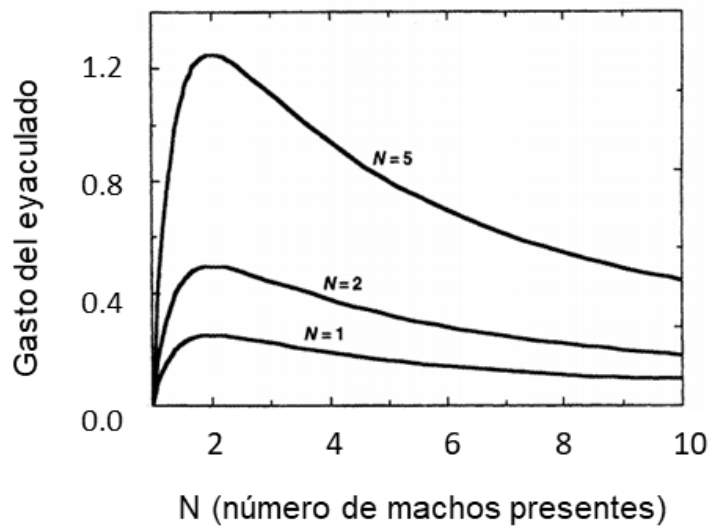


Figura 2. Modelo teórico de intensidad de competencia espermática. Gasto del eyaculado de tres especies diferentes donde los machos tienen perfecta información del número de competidores presentes en la competencia. Así, cuando hay un rival copulatorio el gasto del eyaculado es máximo pero cuando existen más de dos rivales disminuye (modificado de Parker *et al.* 1996).

Respecto a los efectos de la intensidad de competencia sobre el desempeño copulatorio masculino, la evidencia es escasa en roedores. En condiciones de laboratorio, la competencia entre machos de la cepa Long Evans *versus* machos de la cepa F344, disminuye significativamente el número de intromisiones, el intervalo inter-intromisión y la latencia de eyaculación (Dewsbury y Hartung 1980, Moore y Wong 1992). La competencia entre ratas macho silvestres *versus* Sprague-Dawley disminuye el intervalo inter-intromisión (Price 1980). En condiciones semi-naturales, la competencia entre dos machos Sprague-Dawley, incrementa el intervalo inter-intromisión y el intervalo post-eyaculatorio. En el mismo estudio también se encontró que los machos en competencia disminuyen su eficiencia copulatoria o hit rate $[NI/(NM+NI)]$ este parámetro refleja la capacidad del macho para tener erecciones e intromitir (McClintock *et al.* 1982). Este parámetro refleja la capacidad del macho para presentar erecciones y así, realizar intromisiones (McClintock *et al.* 1982).

1.3 Conducta copulatoria y fenotipos copulatorios de la rata macho

La conducta copulatoria puede ser agrupada de acuerdo con el patrón copulatorio exhibido por los machos. Dewsbury (1972) propuso una clasificación sistemática para comparar los patrones copulatorios de los machos entre las distintas especies de mamíferos considerando cuatro atributos durante la cópula. El primero se refiere a que las especies pueden o no mostrar candado genital; el segundo atributo hace referencia a la presencia o ausencia de empujes pélvicos durante las intromisiones; el tercero consiste en realizar o no múltiples intromisiones durante la cópula y el último considera si el macho ejecuta o no múltiples eyaculaciones. Se diferencian 16 patrones. La rata muestra el patrón 9 porque no hay candado genital, los machos realizan empujes pélvicos y múltiples intromisiones previos a la eyaculación y, además, realizan múltiples eyaculaciones (Dewsbury 1972).

La conducta copulatoria de la rata macho se caracteriza por la ejecución de tres patrones motores copulatorios conocidos como monta, intromisión y eyaculación (Larsson 1956, Lucio y Tlachi-López 2008). Durante la monta, el macho palpa los flancos femeninos con sus extremidades anteriores y realiza movimientos pélvicos hacia adelante y hacia atrás sobre la grupa de la hembra (**Figura 3A**). En la intromisión, el macho además de realizar la monta inserta el pene en la vagina mediante un movimiento pélvico profundo seguido de la desmonta brusca y el auto-acicalamiento genital hembra (**Figura 3B**). La eyaculación se caracteriza por un movimiento pélvico más profundo y sostenido que el de la intromisión acompañado de la expulsión seminal hembra (**Figura 3C**). Tras la deposición del semen en la vagina ocurre la desmonta lenta. El macho levanta el tronco y extiende lateralmente sus extremidades anteriores (Larsson 1956, Lucio y Tlachi-López 2008).



Figura 3. Conducta copulatoria en la rata macho (*Rattus norvegicus*). Se observa la ejecución de diversas posturas y movimientos del macho que permiten la monta (A), la inserción peneana o intromisión (B) y la expulsión seminal o eyaculación (C).

La actividad copulatoria de la rata macho puede registrarse y analizarse de manera manual, para ello cada patrón motor copulatorio se representa con diferentes símbolos en una hoja de registro. Los símbolos se colocan siguiendo la secuencia de los parámetros copulatorios que el macho realiza durante el encuentro sexual (Lucio y Tlachi-López 2008). De esta forma se facilita visualizar el número de patrones copulatorios realizados antes de cada eyaculación, así como la secuencia espacio-temporal de cada patrón (**Figura 4**).

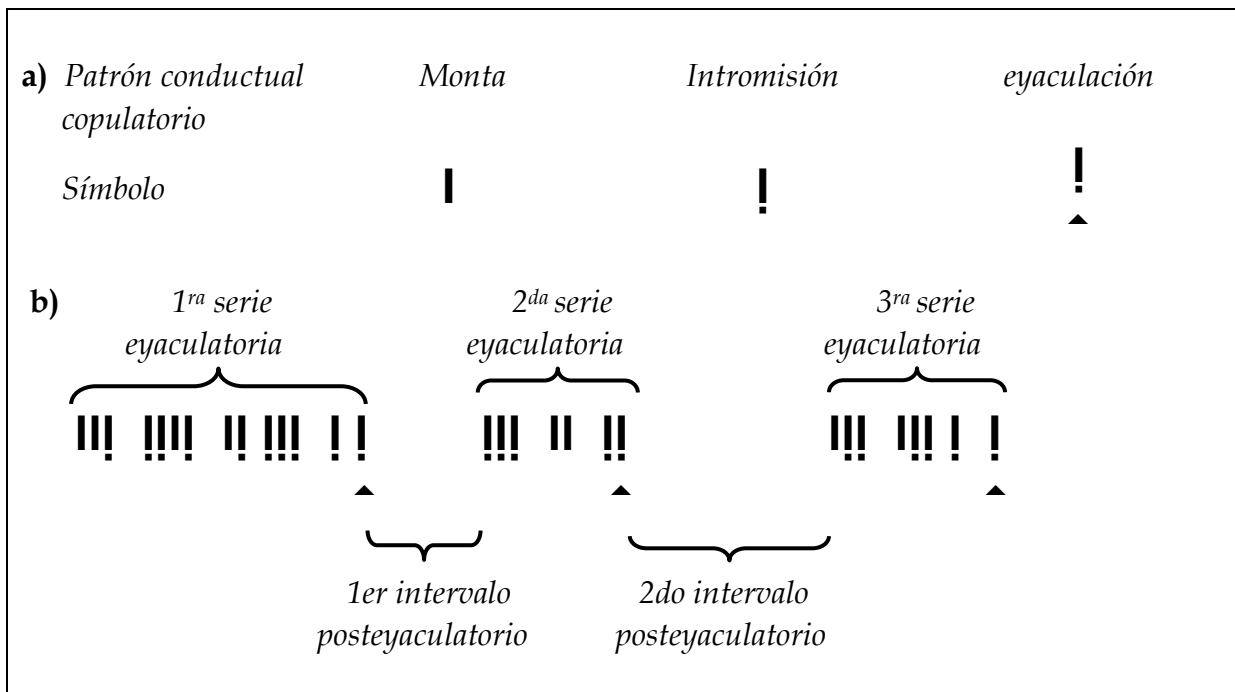


Figura 4. Esquema que representa los patrones motores copulatorios. **a)** Diferentes símbolos representan a la monta, intromisión y eyaculación. **b)** Se ejemplifica un encuentro copulatorio de tres series eyaculatorias. La primera serie consta de cuatro montas y nueve intromisiones; la segunda, de dos montas y cuatro intromisiones; la tercera, dos montas y cinco intromisiones (Lucio y Tlachi-López 2008).

Al conjunto de montas e intromisiones intercaladas que realiza el macho y que culminan con la eyaculación se le conoce como serie eyaculatoria. La serie eyaculatoria de cada macho puede durar diferente tiempo [segundos (s)] a esto se le llama duración de la serie eyaculatoria. Esta se define como el intervalo de tiempo que transcurre desde que se introduce a la hembra al redondel donde se encuentra el macho hasta que ocurre la eyaculación.

Una vez que ocurre la eyaculación, el macho presenta el intervalo post-eyaculatorio, de aproximadamente 5-10 minutos (min). Durante este periodo, el macho es insensible a cualquier estímulo, incluso sexual y da la apariencia de estar dormido (Larsson 1956). Después de ese tiempo, el macho reanuda la conducta copulatoria y puede realizar de 5 a 10 series eyaculatorias más con la misma o diferente hembra (Fernández-Guasti y Rodríguez-Manzo 2003, Tlachi-López *et al.* 2012).

Los patrones de monta, intromisión y eyaculación pueden evaluarse mediante los parámetros copulatorios: número de montas y número de intromisiones, latencia de monta, latencia de intromisión y latencia de eyaculación. Además, se calcula el intervalo inter-intromisión (Larsson 1956, Lucio y Tlachi 2008). Las ratas macho presentan diferencias en algunos de sus parámetros copulatorios lo que da lugar a la existencia de tres fenotipos copulatorios: rápido, normal y lento. Estas diferencias en la conducta copulatoria se han evaluado en condiciones de laboratorio (Pattij *et al.* 2005, Olivier *et al.* 2006). De acuerdo con Olivier *et al.* 2006, los fenotipos difieren significativamente en el número de eyaculaciones *e.g.*, series eyaculatorias realizadas en determinado tiempo. Aquellos que realizan de 0-1 eyaculación durante 30 min son los machos lentos; los que ejecutan de 2-3 son normales y los que presentan 4-5 son los rápidos. Los fenotipos también difieren en el número de montas (rápidos = 8.2 ± 1.8 ; normales = 23 ± 4 y lentos = 42 ± 4) y sobre todo en su latencia de eyaculación (rápidos = 247 ± 45 segundos (s); normales = 717 ± 133 s y lentos = 1697 ± 80 s).

1.4 Eyaculado de la rata macho

Durante la eyaculación, la rata macho deposita el semen en la vagina. El semen consta de espermatozoides y secreciones de las glándulas sexuales accesorias (próstata, coagulantes y vesículas seminales; Mann 1964, Mann y Lutwak-Mann 1981, Setchell *et al.* 1994). Después de que el macho eyacula, la mayoría de las secreciones de las glándulas accesorias se endurecen en la vagina y forman el tapón copulatorio (Blandau 1945, Matthews y Adler 1978, Voss 1979, Williams-Ashman 1984). El tapón favorece el transporte espermático transcervical al adherirse fuertemente a las paredes vaginales, lo que genera presión e impulsa a los espermatozoides depositados en la vagina hacia el cérvix y cuernos uterinos (Blandau 1945, Matthews y Adler 1977, Tlachi-López *et al.* 2011). Dicho transporte espermático transcervical en la rata ocurre en

un periodo de 5-10 min (Matthews y Adler 1977). El intervalo post-eyaculatorio del macho, que dura también entre 5-10 min, evita al macho retirar su propio tapón y con ello interrumpir el transporte de sus espermatozoides (Matthews y Alder 1977, McClintock *et al.* 1982). El tapón también funciona como barrera física que impide a otro macho eyacular, de inmediato, en una hembra previamente inseminada (Voss 1979, Dewsbury 1988, Sutter *et al.* 2016). Sin embargo, otro macho distinto al que eyaculó, puede retirar el tapón de la vagina al realizar algunas intromisiones (Lucio *et al.* 1994, Tlachi-López *et al.* 2012, Lucio *et al.* 2014). De esta forma, el macho que retira el tapón puede depositar su semen en la hembra recién inseminada por otro y así promover la competencia espermática (Birkhead y Moller 1998, Gomendio 2002, Lucio y Gutiérrez-Ospina 2006). Retirar el tapón copulatorio de la vagina antes de que ocurra tal transporte espermático es una estrategia adaptativa ya que se puede interrumpir o evitar tal transporte espermático del macho que eyaculó previamente (Adler y Zolot 1970, Mathews y Adler 1977). La remoción del tapón es posible debido a las espinas en el glande del pene (Hart 1983, Sachs 1983, Wallach y Hart 1983, Sachs *et al.* 1984). Las espinas se erigen durante la intromisión cuando el pene está erecto y se enganchan al tapón alojado en la vagina. La desmonta que ocurre después de cada intromisión acerca el tapón al orificio vaginal. Bastan 3-4 intromisiones para retirarlo de la vagina (Sachs 1983, Sachs *et al.* 1984). Por otro lado, las espinas del pene estimulan la vagina-cérvix provocando el reflejo neuroendocrino que incrementa la prolactina que favorecerá la implantación del blastocisto en caso de haber ocurrido la fertilización (Sachs 1982, O'Hanlon y Sachs 1986). Así, la presencia de espinas peneanas representa una adaptación para la competencia espermática (Hooper 1960, 1962).

1.5 Conducta copulatoria de la rata hembra

El comportamiento sexual femenino de la rata incluye tres componentes: atractividad, proceptividad y receptividad (Beach 1976). La atractividad comprende cambios en la coloración de la piel perigenital y la producción de secreciones odoríferas perineales que le permiten al macho identificar a la hembra como pareja potencial (Beach 1976, Moralí y Beyer 1979).

La proceptividad incluye el repertorio de conductas de solicitud (Beach 1976, McClintock y Adler 1978, Erskine 1989). Tales conductas son “ear-wiggling”, “darting” y “hopping”. El “ear-wiggling” se refiere a los rápidos movimientos de la cabeza que provocan el movimiento de las orejas. El “darting” es la ejecución de carreras cortas en zig-zag. El “hopping” son pequeños saltos que terminan con la hembra agazapada esperando a ser montada por el macho (Beach 1976, Madlafousek y Hliňak 1977). Las conductas proceptivas motivan sexualmente a los machos, incitándolos a iniciar la cópula, particularmente son necesarias para aquellos machos sin experiencia sexual (Beach 1968, 1976).

La receptividad se refiere al estado de responsividad de la hembra para permitir el contacto genital y se identifica por la ejecución de la lordosis, postura que facilita la inserción peneana y la eyaculación (Beach 1976, Madlafousek y Hliňak 1977, McClintock y Adler 1978, Erskine 1989). La lordosis consiste en la dorsiflexión cóncava de la columna vertebral (elevación de la grupa y cabeza y desviación lateral de la cola para exponer el orificio vaginal). La lordosis es un reflejo espinal que ocurre en respuesta a la estimulación en los flancos provocada por la palpación del macho con sus extremidades anteriores durante la monta (Beach 1976). Este reflejo sólo ocurre cuando la hembra está receptiva y se debe a las concentraciones de hormonas gonadales: estradiol y progesterona (Vega-Matuszczyk y Larsson 1991).

1.5.1 Cópula regulada por la rata hembra

El comportamiento copulatorio de los roedores ha sido estudiado desde sus inicios en condiciones en las que el macho controla la interacción sexual (Bermant 1961, Schoelch-Krieger *et al.* 1976). Hoy en día, es ampliamente conocido que el comportamiento sexual es resultado de la interacción dinámica y coordinada entre el macho y la hembra (Larsson 1973, Beach 1976, Schoelch-Krieger *et al.* 1976, McClintock and Adler 1978, Sachs and Garinello 1980, Erskine 1989, Erskine *et al.* 1989, Hlinak 1990). Las hembras tienen un papel muy activo antes, durante y después del apareamiento. Previo al apareamiento, ellas pueden elegir al padre de sus hijos; durante el apareamiento, ellas tienen la capacidad de regular la cópula y después del apareamiento pueden elegir a los espermatozoides que fertilizarán sus óvulos (elección críptica, McClintock 1974 en Schoelch-Krieger *et al.* 1976, Beach 1976, McClintock y Adler 1978, McClintock y Anisko 1982, Pfeifle y Edwards 1983, Erskine 1985, Broekman *et al.* 1988, Erskine 1989, Andersson 1994, Eberhard 1996, Ferreira-Nuño *et al.* 2005).

La manera en la que la hembra regula la cópula o “pacing” (término en inglés, más comúnmente utilizado) es alejándose o aproximándose al macho (Beach 1976, McClintock y Adler 1978, McClintock y Anisko 1982, Erskine 1985, 1989). La cópula regulada permite que la hembra controle el tiempo que transcurre entre las estimulaciones perineales, provistas por las montas, o bien, entre aquellas vagino-cervicales, provistas por las intromisiones y/o eyaculaciones (Bermant 1961, Bermant y Westbrook 1966, McClintock y Adler 1978, McClintock 1984, Erskine 1985, 1989).

En condiciones naturales y semi-naturales, la conducta de cópula regulada es posible dado que la hembra puede alejarse del macho al esconderse dentro de alguna madriguera o detrás de un arbusto o debajo de una piedra (McClintock 1974, McClintock y Adler 1978, McClintock y Anisko 1982, McClintock 1984). En condiciones de laboratorio, la hembra está imposibilitada

para regular la cópula, porque tradicionalmente se utiliza una arena-copulatoria amplia solo con cama de aserrín, no hay objetos que sirvan como guarida para la hembra o que le permitan estar fuera del alcance del macho. No obstante, si a la arena-copulatoria se le añade un compartimento al que sólo tienen acceso la hembra, ella podrá regular la cópula. El compartimento que se añade se conoce como neutro, es donde la hembra puede permanecer fuera del alcance del macho. La arena-copulatoria debe colocarse adyacente al compartimento neutro y constituyen la arena para cópula regulada por la hembra (Mendelson y Gorzalka 1987, Ferreira-Nuño *et al.* 2005, Portillo *et al.* 2012).

La cópula regulada por la hembra es una conducta y como tal, puede ser registrada y evaluada. Utilizando estas arenas para cópula regulada se ha evidenciado que a mayor intensidad de estimulación vagino-cervical recibida, es decir, después de la eyaculación, mayor es el tiempo que tarda la hembra en regresar a la arena-copulatoria con el macho *versus* el tiempo que transcurre tras una intromisión o una monta (Bermant 1961, Peirce y Nuttall 1961, Schoelch-Krieger *et al.* 1976, Erskine 1985).

La hembra regula la cópula cuando está sexualmente receptiva, *i.e.*, durante la fase de estro (Fadem *et al.* 1979). Se ha sugerido que esta conducta es una actividad innata y estable del comportamiento sexual femenino (Erskine 1989) y sucede en condiciones naturales (Calhoun 1963, Telle 1966), semi-naturales (McClintock y Adler 1978, McClintock *et al.* 1982) o de laboratorio (Pierce y Nuttall 1961, Schoelch-Krieger *et al.* 1976, Erskine 1989, Paredes y Vázquez 1999). La mayoría de las ratas hembra (80%) regulan la cópula cuando lo permiten las condiciones de laboratorio (Ferreira *et al.* 2005), y es más evidente cuando la hembra copula con machos sexualmente activos que con machos sexualmente pasivos (Gilman y Westbrook 1978).

Cuando la hembra tiene la oportunidad de regular la cópula, el número de intromisiones que ejecuta el macho previamente a la eyaculación disminuye en promedio a seis (Erskine 1989, Pfaus *et al.* 1999, Camacho *et al.* 2004). Asimismo, se ha mostrado que la cópula regulada por la hembra es más efectiva que las cópulas no-reguladas para inducir preñez. Cinco intromisiones del macho durante la cópula regulada por la hembra son efectivas para activar al cuerpo lúteo, comparadas con 10-12 intromisiones sin cópula regulada (Gilman *et al.* 1979, Erskine *et al.* 1985, 1989). No obstante, para la hembra son necesarias al menos 10 intromisiones para que la cópula le resulte recompensante (McClintock y Anisko 1982). Por ello, podrá completar las 10 intromisiones al seguir copulando con otros y alcanzar la recompensa sexual (efecto placentero de la cópula debido al incremento de dopamina, Agmo 1999). Se ha mostrado que 10 intromisiones abrevian el estro a 12-15 h en vez de las 18 h de duración (Erskine 1985).

Durante la cópula regulada por la hembra, el intervalo inter-intromisión incrementa de 30 s durante la cópula no-regulada a 80 s (Gilman *et al.* 1979). Otro trabajo realizado en condiciones semi-naturales también encontró que el intervalo inter-intromisión incrementó de 144 a 600 s durante la cópula regulada (McClintock y Anisko 1982). Un estudio más, realizado en condiciones de laboratorio, encontró que también se incrementa de 53 a 62 s durante la cópula regulada (Erskine *et al.* 1989).

Respecto a la latencia de eyaculación, sólo un estudio ha mostrado que este parámetro incrementa durante la cópula regulada *versus* la no-regulada (251.1 s *versus* 170.9 s, respectivamente, Erskine *et al.* 1985). Finalmente, cuando la hembra regula la cópula tiene más crías por camada (Coopersmith y Erskine 1994). En este estudio se evaluó la fertilidad de ratas hembra que recibieron una serie eyaculatoria cuando ellas podían o no regular la cópula. Posteriormente, las hembras fueron alojadas en jaulas individuales hasta el día del parto y se cuantificó el número de crías. Otro grupo de hembras fueron sacrificadas en el día 7, 14 ó 21

después de la cópula y se determinó el número de sitios de implantación o de fetos viables. Dado que el número de intromisiones que realizaron los machos en la serie eyaculatoria varió, los datos obtenidos de la cópula regulada y no regulada fueron divididos en dos subgrupos, las hembras que recibieron menos de ocho intromisiones y aquellas que recibieron nueve o más intromisiones. El estudio reveló que el número de crías fue mayor en el grupo de hembras que regularon la cópula (14 crías) respecto a las que no regularon la cópula (11 crías) cuando las hembras recibieron ocho o menos intromisiones (Coopersmith y Erskine 1994).

Resumiendo, dado que la competencia espermática es un evento común en la naturaleza sería interesante analizar las diferentes estrategias conductuales copulatorias que juegan las ratas macho cuando se aparean en presencia de rivales incluyendo los cambios en el eyaculado. La teoría de la competencia espermática propone que los machos ajustan el número de espermatozoides que expelen dependiendo del riesgo o la intensidad de la competencia. El modelo teórico de intensidad de competencia espermática predice que cuando existe solamente un rival, y los machos involucrados tienen información de la competencia, deberían incrementar el gasto del eyaculado; mientras que si el número de machos que compiten supera a dos, reducirían el número de espermatozoides eyaculados. Así, este estudio pretende probar, de manera independiente, algunas predicciones del modelo teórico con evidencias experimentales utilizando como modelo a la rata de laboratorio. Además, pretende ampliar el modelo de competencia espermática. Por tal razón, se incluyeron otras variables que pueden influir en el resultado de la competencia como la presencia de fenotipos copulatorios y la participación de la hembra durante la competencia (cópula regulada).

2. HIPÓTESIS

La cópula regulada por la hembra durante la competencia entre dos ratas macho del mismo fenotipo copulatorio modificará la ejecución copulatoria y las características del eyaculado.

2.1 Predicciones

Se incrementará la latencia de eyaculación y el intervalo inter-intromisión y disminuirá el número de intromisiones del macho ganador.

Se incrementará el número de espermatozoides expelidos y la movilidad espermática se mantendrá en el valor estándar en el eyaculado del macho ganador.

NOTA: El macho ganador es aquel que eyacula primero durante la competencia entre dos machos del mismo fenotipo copulatorio.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar la conducta copulatoria y el eyaculado de machos de distinto fenotipo copulatorio en competencia cuando la hembra regula la cópula.

3.2 Objetivos Específicos

- 1) Evaluar en contexto de no-competencia, los parámetros copulatorios y seminales de machos de fenotipo rápido y fenotipo normal durante la cópula regulada por la hembra.

- 2) Analizar en contexto de competencia, los parámetros copulatorios y seminales de machos de fenotipo rápido y fenotipo normal cuando la hembra regula la cópula.

4. ANTECEDENTES

4.1 Consecuencias de la presencia de rivales sobre la cópula y el eyaculado de la rata macho

El modelo teórico de intensidad de competencia espermática predice que cuando existe un rival copulatorio, el macho que eyacula incrementa el gasto espermático, refiriéndose al número de espermatozoides eyaculados. El incremento en el número espermático no es suficiente para asegurar el éxito del apareamiento. Otros parámetros del semen como la movilidad espermática, entre otros, también son importantes. No obstante, la predicción teórica deja al margen esas otras características relacionadas con la calidad del eyaculado. Nuestro grupo de investigación evaluó el efecto de la intensidad de competencia sobre distintas características del eyaculado, analizando concomitantemente, el desempeño copulatorio en la rata de laboratorio (*Rattus norvegicus*). Se muestra que durante la cópula de competencia (dos machos y una hembra), efectivamente se incrementa significativamente el número de espermatozoides eyaculados respecto a la cópula de no-competencia (un macho y una hembra, Fuentes-Morales *et al.* 2020). Sin embargo, el porcentaje de espermatozoides con movilidad espermática progresiva (movimiento individual de los espermatozoides que siguen una trayectoria rectilínea) disminuye drásticamente durante la competencia *versus* la no-competencia. El resto de los parámetros del eyaculado son similares entre los dos contextos copulatorios (Fuentes-Morales *et al.* 2020).

Respecto a la conducta copulatoria, la latencia de eyaculación y el intervalo inter-intromisión disminuyen significativamente durante la competencia en relación a la no-competencia. El resto de los parámetros copulatorios son similares entre ambos contextos copulatorios (Fuentes-Morales 2013, Fuentes-Morales *et al.* 2020). Estos resultados sugieren

que la presencia de rivales durante la cópula afecta tanto a la calidad del eyaculado como el desempeño copulatorio, es decir, la intensidad de competencia no sólo tiene consecuencias en el gasto espermático.

4.2 Consecuencias de la presencia de rivales sobre la cópula y el eyaculado de machos normales y rápidos

4.2.1 Fenotipos copulatorios y el eyaculado

El único estudio que ha evaluado las características seminales de machos de diferente fenotipo copulatorio también fue realizado por nuestro grupo de investigación. Los machos de fenotipo rápido y los de fenotipo normal tienen parámetros seminales similares (Fuentes-Morales 2013).

En relación con la conducta copulatoria, la latencia de eyaculación de los machos rápidos es significativamente menor que la de los normales. Los machos rápidos realizan significativamente menos intromisiones que los normales. El resto de los parámetros copulatorios fue similar entre fenotipos (Fuentes-Morales 2013).

4.2.2 Competencia entre machos considerando el fenotipo copulatorio: efectos sobre la cópula y el eyaculado

Nuestro grupo de investigación recientemente evaluó en la rata de laboratorio los efectos de la presencia de un rival sobre el eyaculado y la conducta copulatoria considerando el fenotipo eyaculatorio. Es decir, se encontraban dos machos del mismo fenotipo copulatorio y una hembra en la misma arena copulatoria simultáneamente. Las pruebas terminaban cuando uno de los

machos eyaculaba. Los machos rápidos durante la competencia incrementaron significativamente la cuenta espermática *versus* la no-competencia. La movilidad espermática progresiva es drásticamente disminuida durante la competencia en comparación con la no-competencia. El resto de los parámetros del eyaculado son similares entre los dos contextos copulatorios (Fuentes-Morales 2013). Por otra parte, la competencia entre machos normales sólo disminuye la movilidad espermática progresiva *versus* la no-competencia. El resto de los parámetros seminales son similares entre los dos contextos (Fuentes-Morales 2013).

Respecto a los parámetros copulatorios, la competencia entre eyaculadores rápidos disminuye significativamente la latencia de eyaculación el número de intromisiones y el intervalo inter-intromisión comparada con la no-competencia. El resto de los parámetros seminales son similares entre los dos contextos copulatorios. La competencia entre eyaculadores normales no modifica ningún parámetro copulatorio (Fuentes-Morales 2013).

Estos resultados evidencian que la predicción del modelo de intensidad de competencia espermática no aplica en todos los casos, en la rata, solo se cumplió en los machos rápidos. Así, es importante considerar el fenotipo copulatorio de los machos que compiten. Además, la intensidad de competencia no sólo afecta el número espermático sino también la movilidad espermática. Respecto a la conducta copulatoria, la intensidad de competencia también afecta el desempeño sexual, al menos en los machos de fenotipo rápido. Así, los machos rápidos son más susceptibles a la competencia tanto en el gasto espermático como en el comportamiento sexual. Cabe mencionar que, en estos estudios las condiciones de las pruebas copulatorias permitieron a los machos regular la cópula. El modelo teórico de intensidad no considera la participación de las hembras durante la competencia, que se ha mostrado es de suma importancia.

Por lo anterior, la presente propuesta de investigación considera en primer lugar, evaluar la cópula y el eyaculado de machos en competencia cuando las hembras regulan la cópula. En segundo lugar, evaluar la cópula y el eyaculado durante la competencia entre ratas macho de diferente fenotipo copulatorio cuando la hembra regula la cópula. Esto permitiría considerar desde otra perspectiva el modelo de intensidad de competencia porque incorpora la participación de la hembra, lo que simularía la competencia masculina en condiciones naturales.

5. METODOLOGÍA

5.1 Animales

Se utilizaron ratas Wistar maduras sexualmente. Los animales fueron obtenidos del bioterio del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (UATx) y del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Los machos (250-300 g de peso corporal aproximadamente) fueron alojados individualmente en cajas de acrílico (37 x 27 x 15 cm) desde el día 60 posnatal hasta el último día del experimento. Las hembras (250-300 g de peso corporal aproximadamente) fueron alojadas en grupos de 4-5 individuos en cajas colectivas (47 x 32 x 20 cm). Los animales fueron mantenidos en el bioterio a $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 40% de humedad y con ciclo de luz-oscuridad invertido (12 h luz/12 h oscuridad, la luz se apagaba a las 0800). Se les proporcionó alimento (Purina Chow) y agua *ad libitum*. Los protocolos experimentales fueron revisados y aprobados por el Comité Local de Ética de la Universidad Autónoma de Tlaxcala y fueron llevados a cabo en total cumplimiento con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (NOM-062-Z00-1999).

5.2 Entrenamiento copulatorio

Las ratas macho maduras aunque sexualmente inexpertas, fueron entrenadas durante seis pruebas copulatorias para que adquirieran experiencia sexual. Las pruebas se realizaron en la arena-copulatoria (cilindro de acrílico, 50 cm altura y 52 cm de diámetro), durante la fase oscura del ciclo bajo luz roja tenue. Los machos fueron habituados durante 5 min en la arena-copulatoria y después una hembra ovariectomizada con estro inducido hormonalmente fue introducida en la misma arena (**Figura 5**). El estro fue inducido administrando por vía subcutánea 10 μg de benzoato de estradiol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) seguido de 2

mg de progesterona (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a las 48 y 4 h, antes de cada prueba conductual, respectivamente (Zipse *et al.* 2000, Lucio y Tlachi-López 2008, Tlachi-López *et al.* 2011, Lucio *et al.* 2013). Una vez que la hembra se colocaba con el macho en la arena copulatoria, se encendía el cronómetro e iniciaba la observación y el registro directo por el observador de los patrones motores copulatorios (monta, intromisión y eyaculación). Cada patrón motor copulatorio se representa con diferentes símbolos en una hoja de registro. Los símbolos se colocan siguiendo la secuencia, en el tiempo que ocurre cada patrón motor copulatorio que el macho realiza durante el encuentro sexual (ver ejemplo en los **ANEXOS**). Las pruebas copulatorias se realizaron con intervalo de 3 ó 4 días entre ellas.

Las pruebas de entrenamiento terminaban a los 15 min si solo se observaban montas, ó 30 min después de la primera intromisión ó bien una vez ocurrida la eyaculación. Se consideró sólo una eyaculación *i.e.*, una serie eyaculatoria, en caso de que hubiera, por prueba. Solo los machos que eyacularon al menos en las últimas cuatro de las seis pruebas del entrenamiento fueron identificados como individuos sexualmente expertos.



Figura 5. Arena copulatoria para rata con cama de aserrín.

5.3 Análisis de la cópula sin-competencia y con-competencia

Las pruebas copulatorias se realizaron a intervalos no menores a 2 días ni mayores a 7. Se observó la cópula entre él ó los machos (sin-competencia y con-competencia) con la hembra en la arena copulatoria registrando manualmente los patrones copulatorios en una hoja de registro y posteriormente se obtuvieron los parámetros copulatorios (ver diseño experimental **Figura 6**).

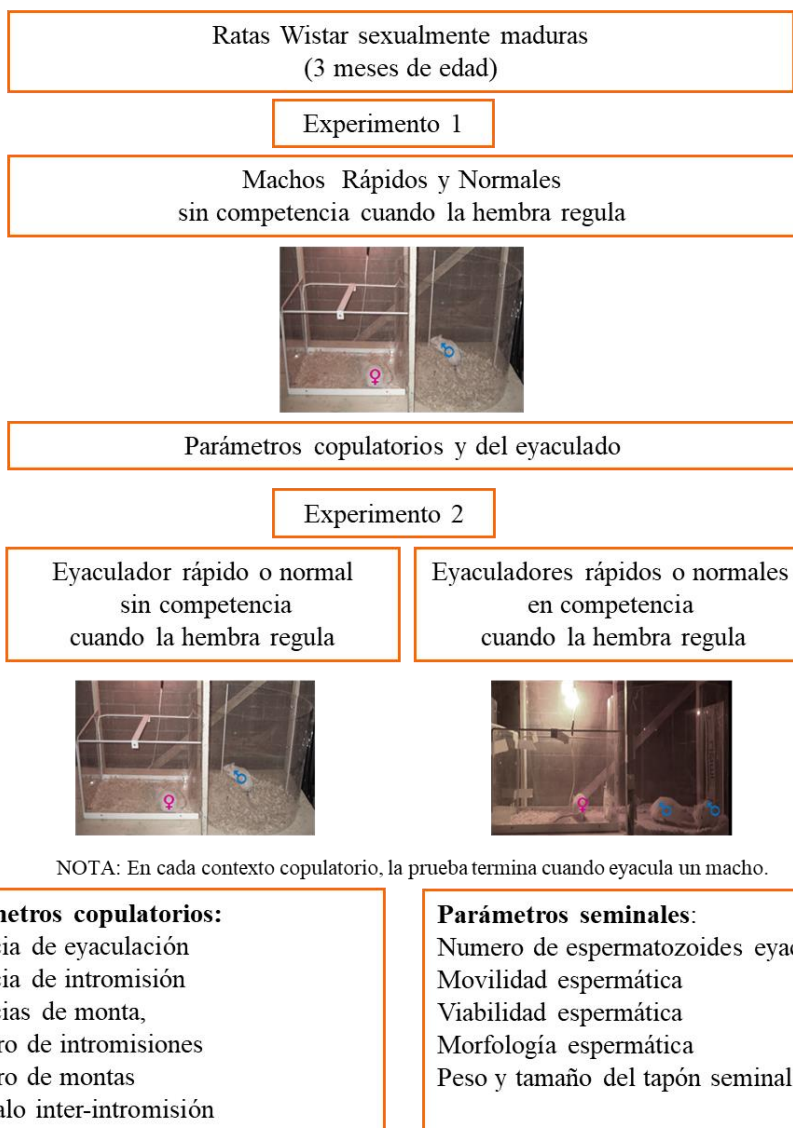


Figura 6. Diseño experimental. El experimento 1 consistió en comprobar si los fenotipos se mantienen o no durante la cópula regulada para ello se probaron a los machos de fenotipo copulatorio Rápido y Normal cuando la hembra reguló la cópula. El experimento 2 tuvo la finalidad de investigar los efectos de la competencia entre machos rápidos y normales sobre la conducta y eyaculado de los machos cuando la hembra regula la cópula.

5.3.1 Parámetros copulatorios

Los parámetros evaluados fueron: latencia de monta, latencia de intromisión, latencia de eyaculación, así como el número de montas y el número de intromisiones. Las latencias de monta e intromisión se refieren al tiempo transcurrido desde la introducción de la hembra en la arena-copulatoria hasta que ocurre la primera monta o intromisión, respectivamente. Se expresa en segundos (s). La latencia de eyaculación es el intervalo de tiempo que transcurre desde la primera intromisión hasta que ocurre la eyaculación, también expresada en s. El número de montas y el número de intromisiones es el recuento simple de estos patrones motores, sin y con inserción del pene en la vagina, respectivamente. El intervalo inter-intromisión se calculó como sigue: latencia de eyaculación/número de intromisiones (Larsson 1956).

5.4 Análisis del eyaculado

5.4.1 Obtención del fluido uterino y tapón seminal

Después de haber observado el patrón eyaculatorio, solo a la hembra se le permitió permanecer en la arena-copulatoria durante 5 min para que ocurriera el transporte espermático transcervical. Posteriormente, la hembra fue anestesiada con pentobarbital sódico (26 mg/kg vía intraperitoneal; Pfizer, México). Una vez anestesiada, se realizó una incisión abdominal, se identificaron los cuernos uterinos que luego de ser ligados, proximal y distalmente, fueron extraídos de la cavidad abdominal. Inmediatamente después fueron sumergidos en solución fisiológica a 37 °C para retirarles cuidadosamente la grasa y los vasos sanguíneos adyacentes. Una vez limpios, los cuernos uterinos fueron colocados sobre papel absorbente para eliminar el exceso de salina. Finalmente, se hizo una incisión en el extremo proximal de cada cuerno y el contenido de ambos se colectó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, que se mantuvo en un termo-baño a 37 °C (**Figura 7**). La hembra fue sacrificada después de haber obtenido el

contenido uterino y el tapón seminal con una sobredosis de pentobarbital sódico (vía intracardiaca; Pfizer, México).

El tapón copulatorio de cada eyaculación fue obtenido de la vagina quirúrgicamente. Se realizó una incisión desde el orificio vaginal hasta el pubis y después se separó la sínfisis púbica. Posteriormente, se hizo una incisión longitudinal en la pared vaginal dorsal para visualizar el tapón copulatorio. El tapón fue desprendido de la pared vaginal y cervix a los que se encuentra muy fuertemente adherido (Lucio y Tlachi-López 2008, Tlachi-López *et al.* 2011, Lucio *et al.* 2013).

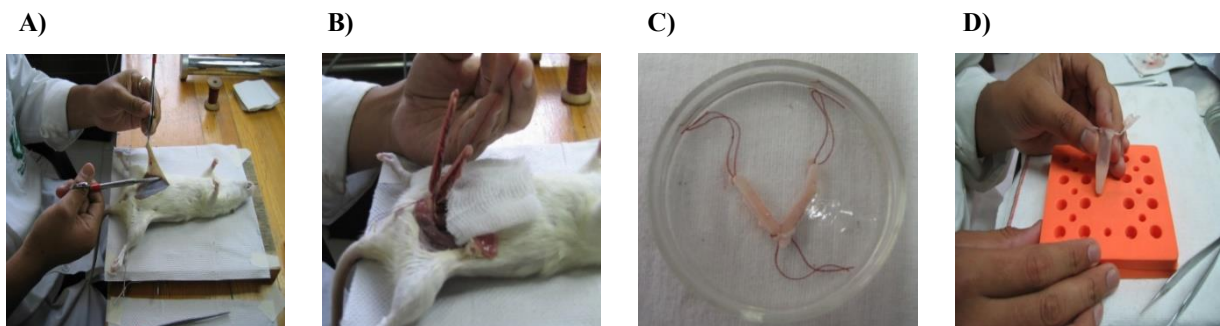


Figura 7. Obtención del fluido cuernos uterinos de una rata hembra recién inseminada. **A)** Incisión amplia en piel y aponeurosis muscular abdominal. **B)** Cuernos uterinos ligados para ser extraídos de cavidad abdominal. **C)** Cuernos uterinos suspendidos en salina limpios de grasa y vasos sanguíneos adyacentes. **D)** Tubo de microcentrífuga conteniendo el fluido colectado de ambos cuernos uterinos.

5.4.2 Parámetros seminales

Los parámetros seminales evaluados fueron cuenta espermática, movilidad espermática, viabilidad espermática y morfología espermática. La cuenta espermática se refiere al número de espermatozoides en 1 ml expresado en millones. Se clasifica en tres categorías: progresiva (espermatozoides con movimientos rectilíneos hacia delante), *in situ* (espermatozoides con movimientos circulares) e inmóvil (espermatozoides sin movimiento). La viabilidad de los espermatozoides es el número de espermatozoides vivos. La morfología espermática es el número de espermatozoides que presentan características normales en cabeza y flagelo. La

motilidad espermática, la viabilidad espermática y la morfología espermática se expresan en porcentaje.

La evaluación de la cuenta espermática consistió en colocar 10 μ l del fluido seminal extraído de los cuernos uterinos, en un portaobjetos (25 x 75 mm) que se cubrió con un cubreobjetos (22 x 22 mm). Después, utilizando un microscopio óptico de fluorescencia (Microscopio Optiphot-2 Nikon, EUA), el número de espermatozoides se cuantificó en tres campos aleatorios para determinar la densidad espermática. Dependiendo del promedio de espermatozoides obtenido de los tres campos, se realizó la dilución correspondiente: 1: 100 (semen: diluyente) corresponde a un rango promedio de 10-60 espermatozoides; 1: 200 a 61-120 espermatozoides; 1: 300 a 121-200 espermatozoides, ó 1: 400 > 200 espermatozoides. A continuación, se tomaron 10 μ l de la dilución y se colocaron en cada una de las dos cuadrículas de conteo del hemocitómetro o cámara de Neubauer (cámara Neubauer con línea doble brillante, Superior Marienfeld, Alemania; **Figura 8**). En cada cuadrícula se localizó el cuadrado grande central (identificado con el número 5) y se contó el número de espermatozoides en 5 cuadrantes (los cuatro de cada esquina y el cuadrante central), utilizando el objetivo 20x del microscopio (**Figura 8**). Posteriormente, el valor obtenido de ambas cuadrículas se promedió y multiplicó por 10^6 para obtener el recuento de espermatozoides en la muestra uterina.

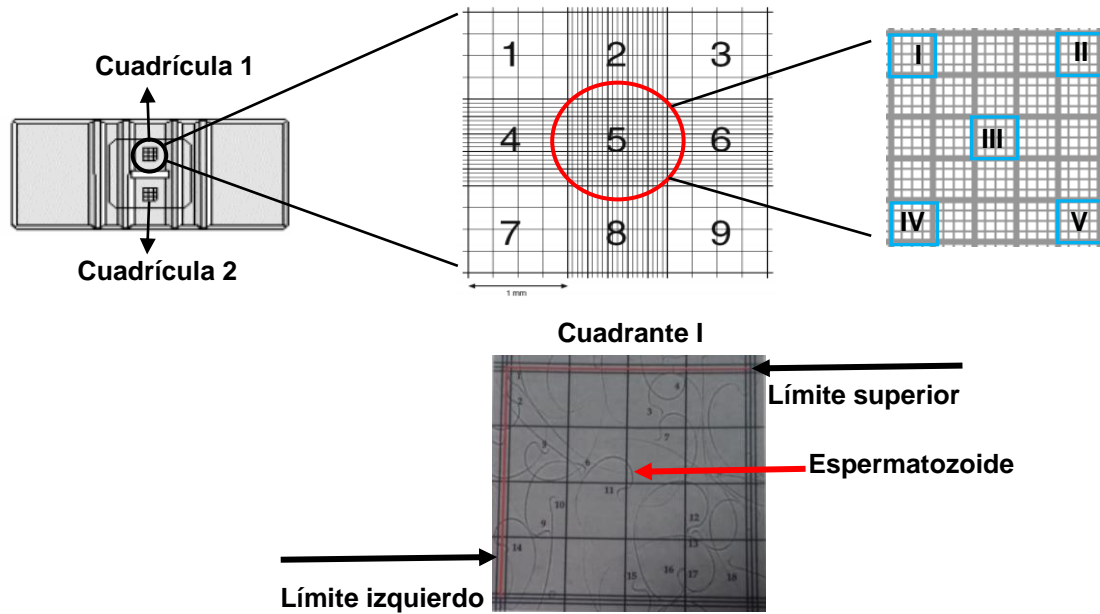


Figura 8. Cámara de Neubauer para conteo de espermatozoides. La cámara tiene dos cuadrículas, cada una está dividida en 9 cuadrados grandes de 1 mm². El cuadrado grande central (en rojo, número 5) está dividido en 25 cuadrados con aristas de 0.2 mm, cada uno de los 25 está subdividido en 16 cuadrados pequeños con aristas de 0.05 mm y una superficie de 0.0025 mm². Se cuenta el número de espermatozoides en los 5 cuadrantes (uno de las cuatro esquinas y el central, los que se muestran en la figura con números romanos). En el conteo de espermatozoides se consideran las cabezas o flagelos de espermatozoides que estén dentro de cada cuadrante, es decir, dentro de los 16 cuadrados más pequeños. Si la cabeza o flagelo del espermatozoide queda sobre la línea roja que forma los límites del cuadrante (superior e izquierdo) estos también se cuentan. Se obtienen el promedio de las dos cuadrículas y el resultado se multiplica por 10⁶.

El análisis de la movilidad espermática requirió de 10 µl de fluido seminal colocado sobre un portaobjetos de microscopio (25 x 75 mm) que se cubrió con un cubreobjetos (22 x 22 mm). Los espermatozoides se clasificaron en aquellos de movilidad progresiva, *in situ* e inmóviles. La motilidad se observó utilizando el objetivo 20x del microscopio. Se contaron cien espermatozoides, un contador digital (Conductronic 220, México). El conteo fue de izquierda a derecha, siguiendo una línea media horizontal en el ocular del microscopio. El número obtenido en cada categoría se expresó como porcentaje.

La evaluación de la viabilidad y morfología espermáticas requirieron de un colorante constituido por nigrosina, eosina y citrato de sodio, todos disueltos en agua destilada. Se colocaron 10 µl del fluido seminal más 10 µl del colorante en un portaobjetos de microscopio y

se mezclaron con un palillo. Las muestras fueron observadas en el microscopio óptico de fluorescencia (Microscopio Optiphot-2 Nikon, EUA), y los espermatozoides teñidos se consideraron muertos; los no teñidos, vivos. Se contaron cien espermatozoides utilizando el objetivo 100x del microscopio. Además, los espermatozoides normales (con una cabeza en forma de hoz y flagelo largo) se distinguieron de los anormales (con doble cabeza o flagelos fragmentados o flagelos en zig-zag). Cien espermatozoides elegidos al azar fueron evaluados usando el objetivo 100x del microscopio. La viabilidad y la morfología de los espermatozoides se expresaron como porcentaje (Lucio y Tlachi-López 2008, Tlachi-López *et al.* 2011, Lucio *et al.* 2013).

5.4.3 Parámetros del tapón seminal

Las medidas del tapón copulatorio fueron tomadas con un vernier digital (Mitutoyo MTC700-113, Japón) e incluyeron el tamaño (longitud y anchura) que fue expresado en milímetros. El peso fue determinado con una balanza analítica (Mettler AE50, USA) y se expresó en miligramos (Lucio y Tlachi-López 2008, Lucio *et al.* 2013).

5.5 Identificación de fenotipos eyaculatorios

Las ratas macho con experiencia sexual se clasificaron en fenotipos eyaculatorios dependiendo de la duración de las latencias de eyaculación en sus pruebas de entrenamiento copulatorio. Cada prueba del entrenamiento copulatorio consistió en una serie eyaculatoria. Los valores de tales latencias de las últimas cuatro pruebas del entrenamiento fueron promediadas para categorizar a los machos en eyaculadores rápidos o normales como se ha realizado previamente (Olivier *et al.* 2006, Fuentes-Morales 2013, ver los **ANEXOS** para una descripción más detallada de los fenotipos copulatorios).

5.6 Entrenamiento femenino para pruebas de habituación de cópula regulada

Las hembras fueron habituadas durante 30 min por tres días en la arena para cópula regulada sin la presencia del macho (**Figura 9**). Esta arena tiene un orificio (5 cm ancho y 3.5 cm altura) en la parte basal por dónde sólo cabe la hembra debido al menor tamaño corporal respecto del macho. Adyacente a la arena-copulatoria está el compartimento neutro (rectángulo de acrílico, 50 cm largo y 30 cm ancho y 30 cm de altura). Por el orificio entra a la arena-copulatoria (donde se encuentra el macho) y sale de la arena-copulatoria al compartimento neutro (para evitar al macho), es así como regula la cópula.

5.7 Cópulas sin-competencia masculina *versus* cópulas con-competencia masculina cuando la hembra regula

Los machos sexualmente expertos fueron clasificados en fenotipos eyaculatorios y analizados en dos contextos copulatorios: sin-competencia y competencia durante la cópula regulada por la hembra.

Sin-competencia durante la cópula regulada por la hembra

Los machos de fenotipo rápido (R; n=28) y los de fenotipo normal (N; n=14) fueron evaluados en pruebas copulatorias mientras la hembra regulaba la cópula. El número de animales de cada fenotipo fue determinado por el número de fenotipos encontrados en la población de ratas del bioterio.

El día de la prueba, el macho se colocó en la arena-copulatoria durante 5 min para su habituación. Al mismo tiempo, se colocó a la hembra (ovariectomizada con estrógeno inducido) en el compartimento neutro (**Figura 9**). El orificio que conecta a las dos arenas se mantuvo cerrado

durante la habituación. Una vez transcurridos los 5 min se retiró la tapa del orificio e inició la observación de los patrones motores copulatorios del macho (montas, intromisiones y eyaculación). Cada patrón motor copulatorio se registró de manera directa por el observador. Además, las pruebas conductuales fueron videograbadas con una cámara (SONY, México, Handycam HDR-CX405). Posteriormente se obtuvieron los parámetros copulatorios convencionales.

Terminada la prueba y habiendo obtenido el fluido uterino de la hembra recién inseminada, se analizaron los parámetros del eyaculado como previamente se mencionó.

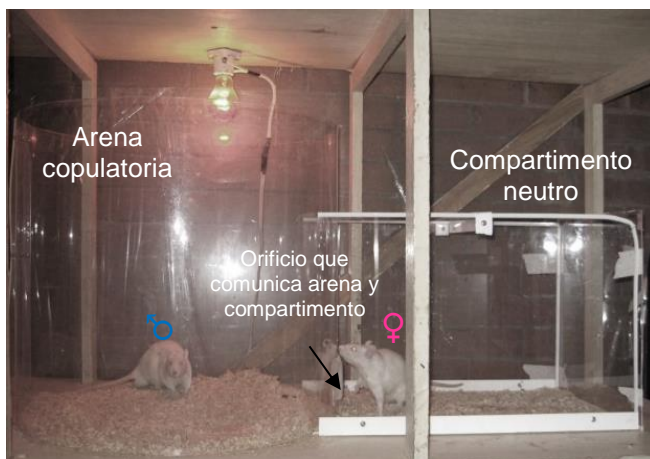


Figura 9. Arena-copulatoria para cópula regulada por la hembra. La arena-copulatoria está adyacente al compartimento neutro, donde la hembra se mantiene alejada del macho.

Competencia durante la cópula regulada por la hembra

Los machos R y N fueron sometidos a pruebas copulatorias de competencia masculina, mientras la hembra regulaba la cópula. Las competencias fueron entre dos machos rápidos ($n=26$, R *versus* R) o dos normales ($n=10$, N *versus* N). Así, el rival de un macho R era otro R y el rival de un macho N era otro N. Esto con la finalidad de que el fenotipo del macho rival no fuera otra variable que influyera con los resultados del estudio.

Los dos machos R o los dos machos N fueron introducidos en la misma arena-copulatória y una hembra (con estro inducido) fue colocada en el compartimento neutro (**Figura 10**). El orificio que conecta a las dos arenas se mantuvo cerrado durante la habituación. Una vez transcurridos los 5 min se retiró la tapa del orificio de la arena copulatória e inició el registro de los patrones motores copulatorios del macho. Estos patrones motores se obtuvieron de manera directa por el observador. La prueba terminó cuando uno de los dos machos eyaculó. Las pruebas conductuales fueron videograbadas con una cámara (SONY, México, Handycam HDR-CX405). Posteriormente se obtuvieron y se registraron los parámetros del eyaculado.



Figura 10. Arena para cópula regulada por la hembra durante la prueba con competencia masculina. Se colocan dos machos en la arena copulatória y una hembra en el compartimento neutro.

5.8 Análisis estadístico

Los parámetros copulatorios se compararon entre la **no-competencia con cópula regulada** (Rápido o Normal) y la **competencia con cópula regulada** de cada fenotipo (Rápido *versus* Rápido o Normal *versus* Normal) mediante la prueba U de Mann-Whitney. Se utilizó la misma prueba estadística para comparar los valores de los parámetros seminales entre los dos contextos copulatorios. El nivel de significancia se fijó en 0.05. Los resultados se expresaron como mediana y primer cuartil-tercer cuartil [mediana, (q1-q3)]. Las pruebas estadísticas se realizaron utilizando el software Sigma Plot versión 11.0 para Windows Vista.

6. RESULTADOS

6.1 Consecuencias de la presencia de un rival sobre la cópula y el eyaculado de la rata macho cuando la hembra regula

6.1.1 Fenotipos copulatorios y eyaculado cuando la hembra regula

Dado que no existían datos de los parámetros copulatorios ni del eyaculado de machos de diferente fenotipo copulatorio cuando la hembra regula la cópula, machos R (n=28) y N (n=14) fueron evaluados en el contexto de no-competencia con cópula regulada por la hembra. La latencia de eyaculación fue significativamente mayor en los machos N respecto de los R cuando la hembra reguló la cópula. El resto de los parámetros copulatorios, así como los parámetros seminales fueron similares entre los machos R y N cuando la hembra reguló el apareamiento (Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros copulatorios y seminales de machos de fenotipo rápido y fenotipo normal durante la cópula regulada.

<i>Parámetros copulatorios</i>	Machos R		Machos N		P
	Mediana	q1-q3	Mediana	q1-q3	
Latencia de eyaculación (s)	308	215.50-439.50	480.50	387-597	0.01**
Número de intromisiones	7	5-10	10	6-11	0.20
Intervalo inter-intromisión (s)	38.51	27.87-65	62.50	35.11-127.16	0.17
Latencia de monta (s)	32	13-69	21.50	15-23	0.14
Latencia de intromisión (s)	34.50	17-91.50	25	17-72	0.60
Número de montas	2	1-4	3	2-8	0.08
<i>Parámetros seminales</i>					
Cuenta espermática (10 ⁶)	44.75	34.50-57.50	52.50	37.50-93.50	0.30
Movilidad espermática (%)	72.50	59-82	65	56-81	0.50
Viabilidad espermática (%)	89.50	82-92	93	83.50-95	0.09
Morfología espermática (%)	95	94-97	95	92.50-97	0.83
Peso del tapón seminal (mg)	94.20	86.85-112.75	95.55	92.50-108.10	0.50
Ancho del tapón seminal (mm)	5	4.70-5.60	5.35	4.90-5.80	0.22
Largo del tapón seminal (mm)	10.40	9.32-10.87	10.65	9.80-11.10	0.47

*p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, U de Mann-Whitney. R = Machos rápidos. N = Machos normales.

6.1.2 Competencia entre machos considerando el fenotipo copulatorio cuando la hembra regula: efectos sobre la cópula y el eyaculado

Los machos R (n=16) que eyacularon durante la competencia con cópula regulada incrementaron significativamente la latencia de eyaculación e intervalo inter-intromisión [592 (300-920) s y 99.75 (41.30-165.27) s, respectivamente] comparados con los machos R sin competencia con cópula regulada [308 (215.50-439.50) s y 38.51 (27.87-65) s, respectivamente] (**Figura 11**). El resto de los parámetros copulatorios fue similar entre los dos contextos copulatorios (**Tabla 3**). Así, la cópula regulada durante la competencia incrementó la duración de la latencia eyaculatoria de los machos rápidos hasta un valor cercano al de los machos normales.

Tabla 3. Parámetros copulatorios y seminales de machos de fenotipo rápido en competencia durante la cópula regulada.

<i>Parámetros copulatorios</i>	No-competencia		Competencia		P
	mediana	q1-q3	mediana	q1-q3	
Latencia de eyaculación (s)	308	215.50-439.50	592	300-920	0.02*
Número de intromisiones	7	5-10	6	4-8	0.08
Intervalo inter-intromisión (s)	38.51	27.87-65	99.75	41.30-165.27	0.006**
Latencia de monta (s)	32	13-69	37	14.50-116.50	0.47
Latencia de intromisión (s)	34.50	17-91.50	37	14.50-164	0.70
Número de montas	2	1-4	2	1-3.50	0.52
<i>Parámetros seminales</i>					
Cuenta espermática (10 ⁶)	44.75	34.50-57.50	63	34-83.37	0.19
Movilidad espermática (%)	72.50	59-82	20	0.75-77.25	0.04*
Viabilidad espermática (%)	89.50	82-92	89	86-92.25	0.46
Morfología espermática (%)	95	94-97	94	89.75-95.25	0.15
Peso del tapón seminal (mg)	94.20	86.85-112.75	91	87.27-110.87	0.64
Ancho del tapón seminal (mm)	5	4.70-5.60	5.10	4.82-5.40	0.98
Largo del tapón seminal (mm)	10.40	9.32-10.87	10	9.12-11.05	0.75

*p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, U de Mann-Whitney.

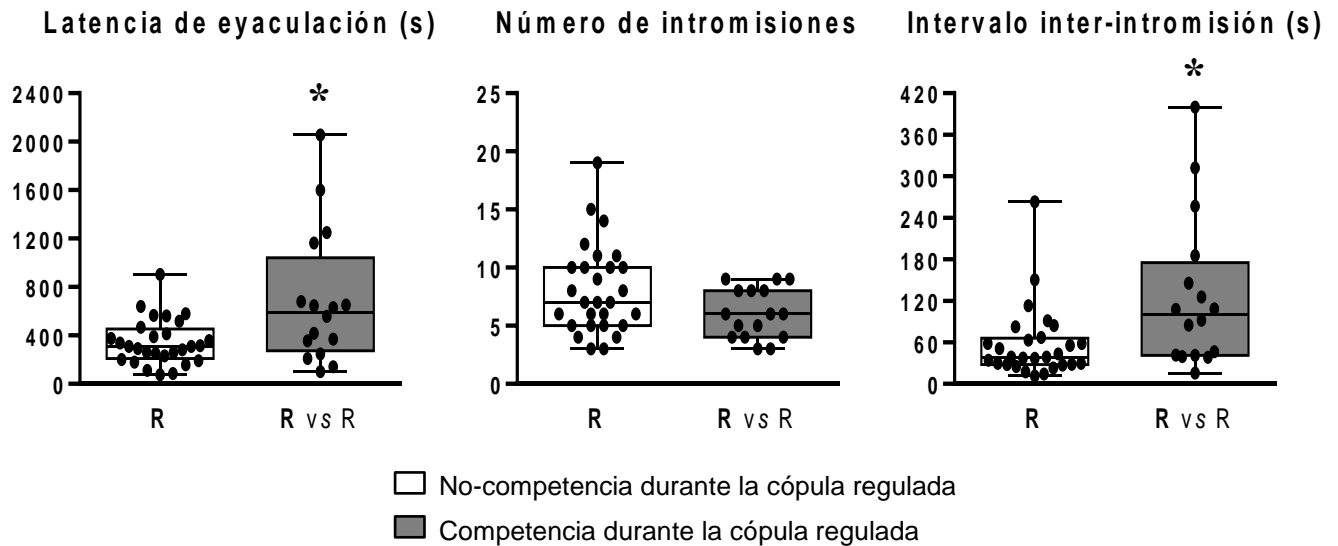


Figura 11. Parámetros copulatorios de machos de fenotipo rápido (R) en competencia durante la cópula regulada. La latencia eyaculatoria y el intervalo inter-intromisión se incrementaron significativamente en competencia respecto de la no-competencia. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, U de Mann-Whitney.

Respecto a los parámetros del eyaculado, la cuenta espermática de los machos R que eyacularon durante la competencia con cópula regulada fue similar a la de los machos rápidos sin competencia con cópula regulada [44.75 (34.50-57.50) millones] *versus* [63 (34-83.37) millones]; respectivamente, **Figura 12**]. Sin embargo, el porcentaje de espermatozoides con movilidad espermática progresiva disminuyó significativamente durante la competencia con cópula regulada [20 (0.75-77.25) %] respecto de la no-competencia con cópula regulada [72.50 (59-82) %]. El resto de los parámetros seminales fue similar entre los dos contextos copulatorios (**Tabla 3**). Así, la cópula regulada durante la competencia incrementó la duración de la latencia eyaculatoria de los machos R hasta un valor cercano al de los machos N.

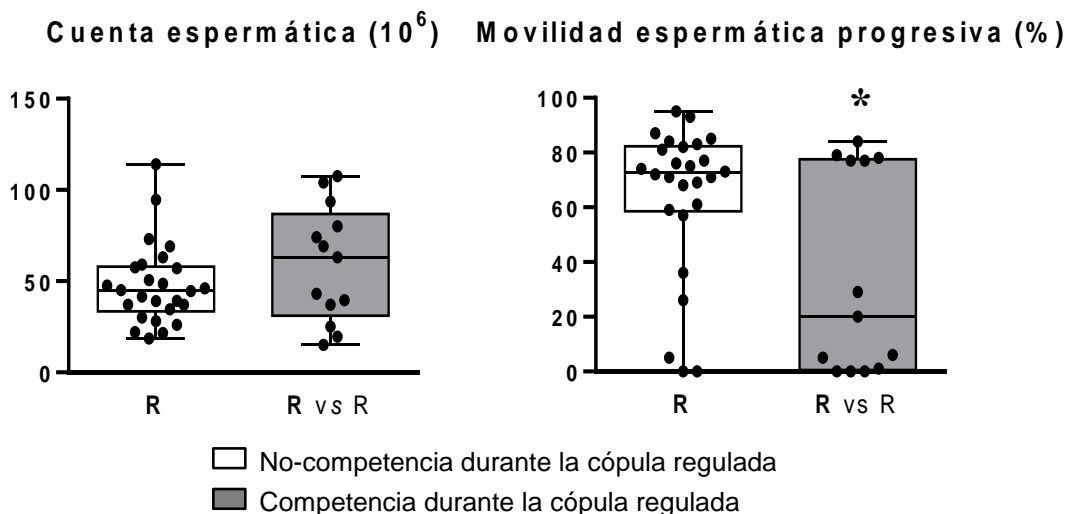


Figura 12. Parámetros del eyaculado de machos de fenotipo rápido (R) en competencia durante la cópula regulada. El número de espermatozoides eyaculados fue similar en la competencia respecto de la no-competencia. No obstante, la movilidad espermática progresiva disminuyó significativamente en la competencia. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, U de Mann-Whitney.

Los machos N ($n=10$) durante la competencia con cópula regulada incrementaron significativamente las latencias de monta y de intromisión [152 (98-221) s y 197.50 (129-354) s, respectivamente] comparados con los machos N durante la no-competencia con cópula regulada [21.50 (15-23) s y 25 (17-72) s, respectivamente, **Tabla 4**]. La latencia de eyaculación, número de montas e intromisiones e intervalo inter-intromisión fueron similares durante los dos contextos copulatorios, **Tabla 4**).

Tabla 4. Parámetros copulatorios y seminales de machos normales en competencia durante la cópula regulada.

<i>Parámetros copulatorios</i>	No-competencia		Competencia		p
	Mediana	q1-q3	mediana	q1-q3	
Latencia de eyaculación (s)	480.50	387-597	422.50	228-663	0.63
Número de intromisiones	10	6-11	8	4-10	0.17
Intervalo inter-intromisión (s)	62.50	35.11-127.16	79.33	38.16-112	0.74
Latencia de monta (s)	21.50	15-23	152	98-221	0.001**
Latencia de intromisión (s)	25	17-72	197.50	129-354	0.001**
Número de montas	3	2-8	3.50	2-9	0.81
<i>Parámetros seminales</i>					
Cuenta espermática (10 ⁶)	52.50	37.50-93.50	33.25	27.50-43	0.12
Movilidad espermática (%)	65	56-81	19	8-38	0.008**
Viabilidad espermática (%)	93	83.50-95	89.50	88-93	0.40
Morfología espermática (%)	95	92.50-97	92.50	91-96	0.12
Peso del tapón seminal (mg)	95.55	92.50-108.10	89.15	87.80-92.60	0.05
Ancho del tapón seminal (mm)	5.35	4.90-5.80	5.10	4.50-5.60	0.29
Largo del tapón seminal (mm)	10.65	9.80-11.10	9.50	8.80-10.10	0.08

*p < 0.05, ** p < 0.01, U de Mann-Whitney.

La cuenta espermática de los machos N que eyacularon durante la competencia con cópula regulada [33.25 (27.50-43) millones] fue similar a la de los machos N sin competencia con cópula regulada [52.50 (37.50-93.50) millones, **Figura 13**]. No obstante, la movilidad espermática progresiva disminuyó significativamente durante la competencia con cópula regulada [19 (8-38) %] respecto de la no-competencia con cópula regulada [65 (56-81) %, **Figura 13**).

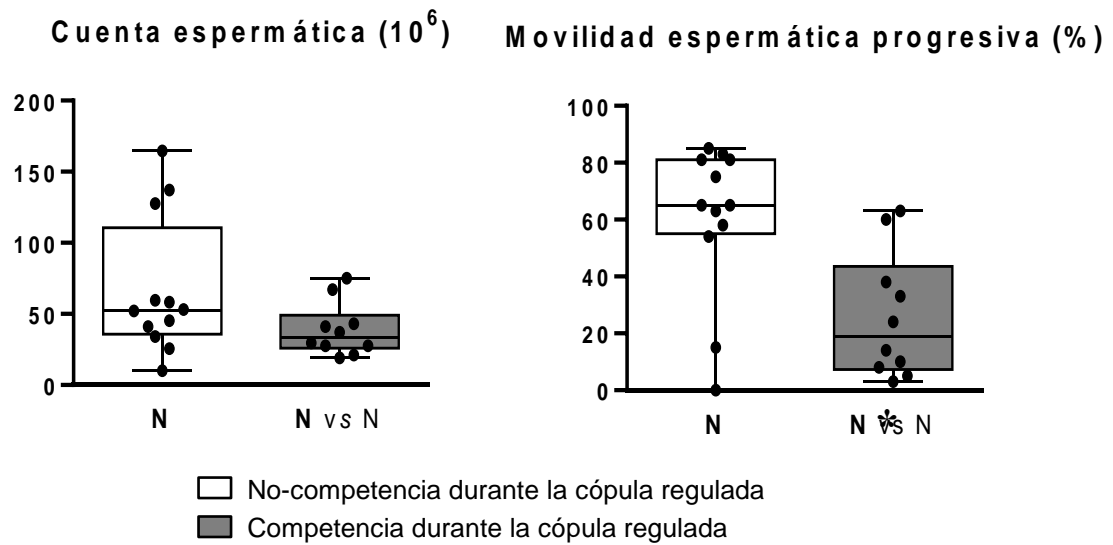


Figura 13. Parámetros del eyaculado de machos de fenotipo normal (N) en competencia con cópula regulada. La cuenta espermática se mantuvo en la competencia, sin embargo, la movilidad espermática disminuyó significativamente. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, U de Mann-Whitney.

7. DISCUSIÓN

7.1 Los fenotipos eyaculatorios se mantienen cuando no existe competencia y la hembra regula la cópula

El presente trabajo doctoral es el primero en analizar si la conducta copulatoria de machos R y N se modifica cuando la hembra regula el encuentro sexual. Encontramos que los machos R y los N mantuvieron la duración de sus latencias de eyaculación y no modificaron su conducta copulatoria. Esto podría significar que la hembra no está regulando la cópula o que copula al ritmo del fenotipo del macho. La primera explicación es poco probable porque se observó en los experimentos que la hembra entraba y salía del compartimento del macho y permanecía un tiempo en la arena neutra lo que describe la conducta de cópula regulada por la hembra. Se ha mostrado que, en condiciones de laboratorio, el 80% de las ratas hembra regulan la cópula (Ferreira-Nuño *et al.* 2005). Así, la segunda explicación es más plausible, cuando la hembra regula la cópula lo hace al ritmo del macho R y del macho N. Entonces, la hembra copula a un ritmo más rápido con el macho R que con el macho N, i.e., la hembra copula al ritmo del fenotipo del macho con el que se está apareando.

Es probable que la hembra pueda detectar cambios sutiles en el desempeño copulatorio de los machos R y N. En estudios previos, nuestro grupo de investigación mostró que los machos R realizan menos intromisiones que los machos N (Fuentes-Morales 2013). Las intromisiones son importantes porque provocan la estimulación mecánica vagino-cervical necesaria para activar el reflejo neuroendócrino que inicia la gestación (Erskine 1985, Erskine *et al.* 1989, Komisaruk y Steinman 1986, Terkel 1986). También, las intromisiones son indispensables para que la cópula sea recompensante para la hembra (efecto placentero de la cópula debido al incremento de dopamina, Agmo 1999). Son necesarias al menos 10 intromisiones cuando ella

regula (McClintock y Anisko 1982). Quizá el macho R al realizar menos intromisiones no le asegura a la hembra la gestación ni le provee la estimulación suficiente para que la cópula sea recompensante y por ello la hembra copula al ritmo del macho para conseguir más estimulación sexual. En contraste, cuando la hembra copula con un macho N, sigue el ritmo del macho. Así, los machos N le proveen más estimulación sexual a la hembra y entonces ella copula a un ritmo más lento respecto del macho R. Esto indica que el ritmo copulatorio del macho N es el adecuado para darle a la hembra la estimulación sexual que necesita para desencadenar la gestación y para que la cópula le sea recompensante (McClintock y Anisko 1982). Es probable que los machos N y no los R tengan más ventajas reproductivas ante la competencia espermática, ya que si ellos realizan más de 10 intromisiones podrían abreviar el estro de 18 a 12-15 h (Erskine 1985) de tal forma que la hembra copularía con un menor número de machos.

Larsson (1961) mostró que en los machos R, el intervalo inter-intromisión es menor comparado con los machos N. En estudios previos, también nuestro grupo encontró el mismo resultado, además que los machos R intromiten menos veces (Fuentes-Morales 2013). Es posible que los machos R realicen intromisiones más vigorosas (Fuentes-Morales 2013). Tal parece que los machos R son más susceptibles a la excitación sexual (Larsson 1961). Es probable que este tipo de conductas sea detectado por la hembra e incluso ella pueda inferir que el macho R es un eyaculador precoz. Así ella copula al ritmo del macho R para recibir más estimulación sexual antes de que el macho eyacule.

Las hembras podrían detectar también cambios sutiles en la duración de las intromisiones y de la eyaculación. Se ha sugerido que la duración de la intromisión está relacionada con la excitación provocada en la hembra (Sachs y Barfield 1974). En estudios previos se ha mostrado que el promedio de la duración de las intromisiones en la rata macho puede variar entre 250, 300 y 470 milisegundos (Stone y Ferguson 1940, Pierce y Nutall 1961, Carlsson y Larson 1962,

Bermant *et al.* 1969). Stone y Ferguson (1940) cuantificaron la duración de la eyaculación en 10 series eyaculatorias sucesivas de ratas macho, encontrando que los valores variaban desde 1 a 4 s, aunque en la primera serie eyaculatoria la duración de la eyaculación era de 1 s (Bermant 1967). Quizá la duración de las intromisiones y eyaculaciones en los machos R es más corta que la de los machos N, de tal forma que los machos R proveen menor excitación sexual a la hembra y ellas copulan al ritmo de los machos R para recibir más estimulación sexual. Estudios futuros deben ser realizados en machos de diferente fenotipo para poner a prueba estas hipótesis.

7.2 El eyaculado de los machos de fenotipo rápido y normal no cambia en las cópulas sin competencia cuando la hembra regula la cópula

Respecto al eyaculado, en estudios previos obtuvimos que los machos R y los N presentan los mismos parámetros seminales sin cópula regulada (Fuentes-Morales 2013). Interesantemente, durante la cópula regulada por la hembra, tampoco observamos diferencias significativas en ningún parámetro seminal entre fenotipos (Fuentes-Morales 2013). Este efecto es de esperarse dado que los machos no modificaron ningún parámetro copulatorio cuando la hembra reguló la cópula, más bien, ellos copularon a su ritmo. El presente trabajo es el primero en analizar la calidad del eyaculado considerando los fenotipos copulatorios de los machos cuando la hembra regula la cópula. Se sabe que cuando la hembra regula la cópula, en experimentos en los que se ignora el fenotipo del macho, el número de crías incrementa (Coopersmith y Erskine 1994). Esto haría suponer que la calidad de los parámetros del eyaculado de los machos durante la cópula regulada por la hembra es mejor. Sin embargo, nosotros obtuvimos que esto no ocurre porque, independientemente del fenotipo, los valores del eyaculado son los mismos. Probablemente, existen otros factores que determinen el incremento en el número de crías cuando la hembra

regula la cópula, ya que se sabe que existen mecanismos internos que la hembra inicia para favorecer la gestación de ciertos machos (elección críptica, Eberhard 1996).

7.3 Los machos rápidos alargan la latencia eyaculatoria durante la competencia; los machos normales no, cuando la hembra regula la cópula

Recientemente, nuestro grupo mostró que los parámetros copulatorios dependen del fenotipo copulatorio de los machos que copulan en la competencia. Cuando compiten dos machos R el que eyacula primero disminuye aún más la latencia de eyaculación, el número de intromisiones y el intervalo inter-intromisión (Fuentes-Morales 2013). Sin embargo, cuando los machos R compiten durante la cópula regulada por la hembra se incrementa significativamente la latencia de eyaculación y el intervalo inter-intromisión hasta valores similares a los de los machos N. Esto sugiere que la hembra al regular la cópula durante una situación de competencia masculina sí es un factor importante que regula la conducta del macho, independientemente de su fenotipo.

Se ha mostrado que hay un número óptimo de intromisiones y un tiempo óptimo entre intromisiones que facilitan la preñez en la rata hembra (intervalo inter-intromisión, Edmonds *et al.* 1972, McClintock y Adler 1978, Erskine *et al.* 1989) y que este efecto es dependiente de la estimulación vaginocervical (Komisaruk y Steinman 1986, Terkel 1986). La hembra, al regular la cópula durante la competencia entre machos R, hace que el macho copule al ritmo de un macho N, ya que incrementa la latencia de eyaculación y el intervalo inter-intromisión, quizá porque a ese ritmo ella recibe la estimulación vagino-cervical adecuada necesaria para inducir el reflejo neuroendócrino que inicia la gestación.

En estudios previos evaluamos el efecto de la competencia en machos N encontrando que no modifican ningún parámetro copulatorio durante la competencia. En este estudio, la cópula

regulada durante la competencia tampoco modificó el ritmo copulatorio de los machos N. Esto debido a que los machos N no mostraron diferencias en la latencia de eyaculación, número de intromisiones ni en el intervalo inter-intromisión. Así, los resultados sugieren nuevamente, que es muy probable que en una situación de competencia, el ritmo copulatorio del macho normal sea el adecuado para darle a la hembra la estimulación sexual que necesita y desencadenar la gestación. Entonces, si durante la competencia se consideraba una ventaja eyacular rápidamente ya que el macho podría inseminar más hembras, cuando la hembra regula la cópula esto no tiene sentido, ya que la hembra pone en igualdad de condiciones copulatorias a los machos R y N dado que los dos le proveen la misma estimulación sexual. De esta forma, las hembras podrían controlar la paternidad de su descendencia de una manera sutil a través de diversos mecanismos de comportamiento y fisiológicos (Birkhead y Moller 1993).

7.4 La cuenta espermática no cambia por la competencia entre machos rápidos ni entre machos normales cuando la hembra regula

Algunos estudios realizados en la rata de laboratorio indican que la competencia copulatoria incrementa el número de espermatozoides que inseminan los machos cuando copulan en la presencia de un rival sin contacto físico entre machos (Bellis *et al.* 1990, Pound y Gage 2004). Lo mismo ocurre durante la cópula simultánea entre dos machos y una hembra (Fuentes-Morales *et al.* 2020). Estudios previos de competencia donde se han considerado los fenotipos copulatorios muestran que la cuenta espermática incrementa sólo en machos R (Fuentes-Morales 2013). Sin embargo, cuando la hembra reguló la cópula durante la competencia, encontramos que el número de espermatozoides eyaculados por los machos R fue el mismo comparado con los machos del contexto sin competencia. Se observó lo mismo con los machos

de fenotipo N, en competencia simultánea hubo más espermatozoides depositados en el tracto reproductor femenino, aunque solo fue así cuando la cópula ocurrió sin rival. Es decir, la competencia masculina -independientemente del fenotipo- no incrementa el número de espermatozoides que expulsa el macho cuando la hembra regula la cópula. Se asume que los machos tienen la capacidad de repartir prudentemente sus espermatozoides dependiendo del riesgo o intensidad de competencia espermática (Parker 1970). Así, cuando hay un rival copulatorio, los machos incrementan al máximo el número de espermatozoides inseminados y cuando existen más de dos rivales tienden a disminuir el gasto del eyaculado (Parker *et al.* 1996). Es probable que los machos R no expulsen más espermatozoides durante la competencia con cópula regulada porque quizá pueden inferir que la hembra puede escapar, ya no regresar a copular o que ella podría copular con otros machos rivales. De hecho, se sabe que las ratas macho utilizan señales auditivas, visuales, olfativas y táctiles para inferir la competencia (Pound y Gage 2004). Sería un gasto innecesario para el macho incrementar el número de espermatozoides eyaculados cuando las probabilidades de engendrar descendencia son menores.

7.5 La movilidad espermática de machos rápidos y machos normales disminuye drásticamente por la competencia cuando la hembra regula

Generalmente, se dice que la competencia espermática ha promovido el incremento en la movilidad espermática en especies poliándricas respecto a las monándricas (Firman y Simons 2010). Así, se asume que los espermatozoides más rápidos deberían ser más competitivos durante la competencia espermática porque ellos podrían alcanzar al óvulo más rápidamente que los espermatozoides lentos (Snook 2005). Gómez-Montoto y su grupo (2011) realizaron un estudio comparativo entre 18 especies de roedores (diseño entre-sujetos) con alto riesgo de

competencia espermática y encontraron que se incrementa el número de espermatozoides, así como el porcentaje de espermatozoides móviles, normales y viables comparados con los espermatozoides de roedores con bajo riesgo. Sin embargo, no se ha evaluado experimentalmente, la competencia simultánea entre dos o más machos de la misma especie (diseño intra-sujetos) ni sus efectos sobre la calidad del eyaculado, particularmente, la movilidad espermática, menos aun considerando el fenotipo de los machos rivales y el papel femenino.

Anteriormente, nuestro grupo de investigación, mostró que la competencia masculina disminuye drásticamente la movilidad espermática progresiva y que este efecto es independiente del fenotipo de los machos (Fuentes-Morales 2013). Esto significa que la competencia es la principal causa del decremento en la movilidad espermática. Este resultado es contrario a lo que se sabe de aves y peces. En esas especies se ha mostrado experimentalmente una correlación positiva entre la competencia y la movilidad espermática (Birkhead *et al.* 1999, Burness *et al.* 2004, Gage *et al.* 2004, Snook 2005). Sin embargo, se sabe que la movilidad espermática es susceptible a factores sociales. Un estudio, realizado con ratones, mostró que en una situación de competencia entre varios machos dominantes y subordinados cuando hay hembras, los dominantes se vuelven agresivos, lo que se correlaciona negativamente con la movilidad espermática (Koyama y Kamimura 2000). También se ha mostrado que en ratones subordinados, la actividad espermática fue suprimida quizá por el estrés provocado por feromonas de ratones dominantes (Koyama y Kamimura 2000).

En el presente estudio se muestra que cuando la hembra regula la cópula, la movilidad espermática progresiva disminuye significativamente en el contexto de competencia respecto del de no-competencia, independientemente del fenotipo de los machos. Estos datos sugieren nuevamente que la competencia es la principal causa del decremento en la movilidad espermática, ya que los mismos resultados obtuvimos cuando el macho reguló la cópula durante

la competencia entre machos R y N (Fuentes-Morales 2013). Este efecto podría deberse a tres circunstancias: 1) el macho rival, al saber que está en competencia secreta algunas sustancias que impidan la movilidad espermática. Es claro que esta acción impedirá no solo la movilidad de los espermatozoides del contrincante sino también afectará la movilidad de sus propios espermatozoides. En algunas especies como la rata, los espermatozoides de la cauda epididimaria y vaso deferente están embebidos en inobilina, una proteína visco-elástica secretada por el epidídimo que inmoviliza a los espermatozoides (Usselman y Cone 1983). 2) La presencia de fibronectina en alta concentración reduce la movilidad (Wennemuth *et al.* 2001). 3) El estrés en los machos generado por la competencia y esto repercute en la disminución de la movilidad espermática. Una situación estresante eleva la corticosterona, esto pudiera influir en la liberación de las secreciones de las glándulas sexuales accesorias modificando el volumen y los componentes del plasma seminal, repercutiendo en la movilidad espermática. De igual modo, podría influir en el transporte espermático al modificar la función de la cauda epididimaria o el vaso deferente (Schneider-Kofman y Sheiner 2005). Se ha descrito que en ratones con alto grado de agresividad, la movilidad espermática disminuye y que la actividad espermática también es suprimida quizá por el estrés provocado por las feromonas de ratones dominantes (Koyama y Kamimura 2000). Otra posibilidad es que la hembra ejerce alguna influencia sobre los espermatozoides que alberga en sus conductos reproductivos (selección críptica; Eberhard 1996). Probablemente, tal como sucede en insectos, se secreten compuestos químicos que inmovilicen temporalmente a los espermatozoides. Sugerimos que esta es la opción más viable y que la pérdida de movilidad espermática debido a la competencia sea un efecto momentáneo debido a que se ha mostrado que el número de crías cuando la hembra regula la cópula es mayor (Coopersmith y Erskine 1994). No descartamos que la cópula regulada por la hembra puede tener un efecto positivo sobre la movilidad espermática durante el tiempo en

el que los espermatozoides se encuentran en el tracto reproductor femenino. Así, con estos experimentos no podemos decir que la hembra no es un factor importante que influye tanto en la conducta masculina como en las características del eyaculado durante la competencia. De hecho, en algunos invertebrados, las hembras pueden influir en el movimiento de los espermatozoides que están almacenados (Snook 2005). Se ha mostrado que en la trucha, cuya fertilización es externa y no contienen órganos de almacenamiento, ellas pueden alterar la movilidad espermática a través del fluido ovárico secretado con los huevos (Turner y Montgomerie 2002). Además, en una variedad de taxones es común que los espermatozoides sufran cambios bioquímicos, estructurales y/o de comportamiento dentro de los conductos reproductivos femeninos. Estos cambios incluyen la maduración del espermatozoide, la activación de la movilidad y/o modificaciones necesarias para adquirir la capacidad fertilizante. En los mamíferos, se sabe que el comportamiento del espermatozoide cambia durante su paso por el tracto reproductor femenino adoptando un patrón de movilidad único cuando adquiere la capacidad de fertilizar (capacitación, Lindemann y Kanous 1989, Bedford y Yanagimachi 1992). De hecho, las hembras pueden secretar factores que cambian las características espermáticas para favorecer la fertilización tal como el factor activador de la movilidad espermática que provienen del óvulo (Yoshida *et al.* 2008). Es probable que el ambiente intrauterino y específicamente las moléculas derivadas de la hembra sean agentes de cambio para los espermatozoides (Pitnick *et al.* 2009). Así, también los anticuerpos citotóxicos femeninos contra los espermatozoides pueden jugar un papel fundamental en la elección críptica. De hecho, se ha mostrado que tales anticuerpos inhiben (Menge y Beitner 1989) o reducen la movilidad espermática (Daru *et al.* 1988). Sin embargo, los mecanismos moleculares responsables de estas modificaciones son desconocidos. Así, es posible que la rata hembra, al regular la cópula, como obtiene mayor estimulación sexual, secrete algunas sustancias en el

fluido uterino que favorezcan la movilidad espermática progresiva. En el presente trabajo se obtuvo el eyaculado después de aproximadamente 10 min de haber ocurrido la eyaculación. Por lo que, es probable que la movilidad espermática estuviera disminuida porque aún no se han secretado dichas sustancias. Así es que habría que evaluar la movilidad en distintos momentos post-eyaculatorios para constatar que aumenta. Entonces, es posible que este tipo de mecanismos le confieran a la rata un tipo de control sobre cuáles espermatozoides utilizar para la fertilización (Snook 2005). Así, las hembras pueden asegurar que sus óvulos sean fertilizados por el “mejor espermatozoide” o por espermatozoides de los “mejores machos” sobre todo en una situación de competencia copulatoria y espermática (Eberhard 1996, Birkhead 1998). Estudios futuros necesitan realizarse para saber qué tipo de mecanismos internos o crípticos regulan tales condiciones en la rata. Así, los presentes resultados sugieren que la hembra, al regular la cópula, coloca en igualdad de condiciones a los machos R y N, de tal forma que sea una competencia donde ninguno tenga ventajas y de esa forma seleccionar a los mejores espermatozoides.

8. CONCLUSIONES

Los machos R incrementaron su latencia de eyaculación y el intervalo inter-intromisión hasta valores cercanos a los de los machos N durante la competencia con cópula regulada. Así, la hembra hace que el macho rápido copule al ritmo del macho N.

Los machos N no modifican ningún parámetro copulatorio. Por lo tanto, la hembra promueve la igualdad de condiciones copulatorias a los machos de fenotipo R y N.

Los machos R no incrementan el número de espermatozoides eyaculados durante la competencia con cópula regulada. En consecuencia, la conducta de la hembra puede influir en las estrategias del gasto espermático de los machos.

Los machos N tampoco incrementan el número de espermatozoides eyaculados. Por lo tanto, la hembra promueve la igualdad de condiciones a los machos de fenotipo R y N.

La movilidad espermática progresiva disminuyó independientemente del fenotipo durante la competencia con cópula regulada. Aparentemente, la participación de la hembra durante la cópula no mejora la movilidad espermática. Así que la competencia masculina es el factor principal que determina la pérdida de movilidad espermática. Sin embargo, no se descarta la idea de que existan mecanismos crípticos femeninos puedan influir en la movilidad espermática.

La competencia y la conducta de la hembra son factores que influyen en el desempeño sexual de los machos involucrados y en la calidad seminal dependiendo del fenotipo del macho.

Aparentemente, los machos R son más susceptibles a los efectos de la competencia y de la cópula regulada. Así, la hembra al regular la cópula, promueve la igualdad de condiciones (conductuales y del eyaculado) a los machos R y N, de tal forma que sea una competencia real donde ninguno tenga ventajas y los mejores espermatozoides fertilicen los óvulos. Nuestro estudio confirma la relevancia del papel de la hembra durante la competencia.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler N. T. y Zoloth S. R. 1970. Copulatory behavior can inhibit pregnancy in female rats. *Science*. 168:1480-2.
- Agmo A. 1999. Sexual motivation- an inquiry into events determining the occurrence of sexual behavior. *Behavioural Brain Research*. 105:129-50.
- Andersson M. 1994. *Sexual selection*, Princeton University Press.
- Beach F. A. 1968. Factors involved in the control of mounting behavior by female mammals. En *Perspectives in reproduction and sexual behavior: a memorial to William C. Young*. Diamond M. (ed). Indiana University Press. Pp. 83-131.
- Beach F. A. 1976. Sexual attractivity, proceptivity, and receptivity in female mammals. *Hormones and Behaviour*. 7:105-138.
- Bedford J. M. y Yanagimachi R. 1992. Initiation of Sperm Motility after Mating in the Rat and Hamster. *Journal of Andrology*. 13:444-449.
- Bellis M. A., Baker R. R. y Gage M. J. G. 1990. Variation in rat ejaculates consistent with the kamikaze sperm hypothesis. *Journal of Mammalogy*. 71:479-480.
- Bermant G. 1961. Response latencies of female rats during sexual intercourse. *Science*. 133: 1771-1773.
- Bermant G. 1967. Copulation in rats. *Psychology Today*. 1:52-60.
- Bermant G. y Westbrook W. H. 1966. Peripheral factors in the regulation of sexual contact by female rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 61:244-250.
- Bermant G., Anderson L. y Parkinson S. R. 1969. Copulation in rats: Relations among intromission duration, frequency, and pacing. *Psychonomic Science*. 17:293-294.
- Birkhead T. R. 1998. Cryptic female choice: criteria for establishing female sperm choice. *Evolution*. 52:1212-1218.
- Birkhead T. y Møller A. 1993. Female control of paternity. *Trends in Ecology and Evolution*. 8:100-1004.
- Birkhead T. R. y Moller A. P. 1998. *Sperm competition and sexual selection*. Academic Press. San Diego. Pp. 783.

Birkhead T. R., Martínez J. G., Burke T. y Froman D. P. 1999. Sperm mobility determines the outcome of sperm competition in the domestic fowl. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 266:1759-64.

Blandau R. J. 1945. On the factors involved in sperm transport through the cervix uteri of the albino rat. *American Journal of Anatomy*. 77:253-272.

Broekman M., De Bruin M., Smeenk J., Slob A. K. y Van Der Schoot P. 1988. Partner preference behavior of estrous female rats affected by castration of tethered male incentives. *Hormones and Behaviour*. 22:324-337.

Burness G., Casselman S. J., Schulte-Hostedde A. I., Moyes C. D., Montgomerie R. 2004. Sperm swimming speed and energetics vary with sperm competition risk in bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 56:65-70.

Calhoun J. B. 1963. *The ecology and sociology of the Norway rat*. U. S. Dep. Health, Education and Welfare. Public Health Service. No.1008. Pp.288.

Camacho F., Sandoval C. y Paredes R. 2004. Sexual experience and conditioned place preference in male rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 78:419-425.

Carlsson S. G. y Larsson K. 1962. Intromission frequency and intromission duration in the male rat mating behavior. *Scandinavian Journal of Psychology*. 3:189-191.

Coopersmith C. y Erskine M. S. 1994. Influence of paced mating and number of intromissions on fertility in the laboratory rat. *Journal of Reproduction and Fertility*. 102: 451-458.

Daru J., Williamson H. O., Rust P. F., Himm R. J. y Mathur S. 1988. A computerized postcoital test of sperm motility: comparison with clinical postcoital test and correlations with sperm antibodies. *Archives of Andrology*. 21:189-203.

Del Barco-Trillo J. y Ferkin M. H. 2004. Male mammals respond to a risk of sperm competition conveyed by odours of conspecific males. *Nature*. 431:446-449.

Dewsbury D. A. 1972. Patterns of Copulatory Behavior in Male Mammals. *The Quarterly Review of Biology*. 47:1-33.

Dewsbury D. A. 1988. A test for the role of copulatory plugs in sperm competition in deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *Journal of Mammalogy*. 69:854-857.

Dewsbury D. A. y Hartung T. G. 1980. Copulatory behaviour and differential reproduction of laboratory rats in a two- male, one-female competitive situation. *Animal Behaviour*. 28:95-102.

Eberhard W.G. 1996. *Female control: sexual selection by cryptic female choice*. Princeton University Press.

Edmonds S, Zoloth S. R. y Adler N. T. 1972. Storage of copulatory stimulation in the female rat. *Physiology and Behavior*. 8:161-164.

Endries M. J. y Adler G. H. 2005. Spacing patterns of a tropical forest rodent, the spiny rat (*Proechimys semispinosus*), in Panama. *Journal of Zoology (London)*. 265:147–155.

Erskine M. S. 1985. Effects of paced coital stimulation on estrous duration in intact cycling rats and ovariectomized and ovariectomized-adrenalectomized hormone-primed rats. *Behavioral Neuroscience*. 99:151-161.

Erskine M. S. 1989. Solicitation Behavior in the estrous female rat: a review. *Hormones and Behaviour*. 23:473-502.

Erskine M. S., MacLusky N. J. y Baum M. J. 1985. Effect of 5α -dihydrotestosterone on sexual receptivity and neural progesterin receptors in ovariectomized rats given pulsed estradiol. *Biology of Reproduction*. 33:551-559.

Erskine M. S., Kornberg E. y Cherry J. A. 1989. Paced copulation in rats: effects on intromission frequency and duration on luteal activation and estrus length. *Physiology and Behavior*. 45:33-39.

Fadem B. H., Barfield R. J. y Whalen R. E. 1979. Dose-response and time-response relationship between progesterone and the display of patterns of receptive and proceptive behavior in the female rat. *Hormones and Behaviour*. 13:40-48.

Fernández-Guasti A. y Rodríguez-Manzo G. 2003. Pharmacological and physiological aspects of sexual exhaustion in male rats. *Scandinavian Journal of Psychology*. 44:257-263.

Ferreira-Nuño A., Morales-Otal A., Paredes R. G. y Velázquez-Moctezuma J. 2005. Sexual behavior of female rats in a multiple-partner preference test. *Hormones and Behaviour*. 47:290-296.

Firman R. C. y Simmons L. W. 2010. Experimental evolution of sperm quality via postcopulatory sexual selection in house mice. *Evolution*. 64:1245-1256.

Fuentes-Morales M. R. 2013. Aportaciones al modelo teórico de competencia espermática: evidencias en la rata de laboratorio. Tesis de Maestría.

Fuentes-Morales M. R., Gutiérrez-Ospina G., Fernández-Guasti A., Cruz Y. y Lucio R. A. 2020. Rats ejaculate prematurely and increase the sperm output during competitive mating. *Ethology Ecology and Evolution*. 32:351-360.

Gage M. J. G. 1991. Risk of sperm competition directly affects ejaculate size in the Mediterranean fruit fly. *Animal Behaviour*. 42:1036-1037.

- Gage M. J. G. 1995. Continuous variation in reproductive strategy as an adaptive response to population density in the moth *Plodia interpunctella*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 261:25-30.
- Gage M. J. G. y Baker R. R. 1991. Ejaculate size varies with socio-sexual situation in an insect. *Ecological Entomology*. 16:331-337.
- Gage M. J. G., Macfarlane C. P., Yeates S., Ward R. G., Searle J. B. y Parker G. A. 2004. Spermatozoal traits and sperm competition in Atlantic salmon: relative velocity is the primary determinant of fertilization success. *Current Biology*. 14:44-47.
- Gilman D. P. y Westbrook W. H. 1978. Mating preference and sexual reinforcement in female rats. *Physiology and Behavior*. 20:11-14.
- Gilman D. P., Mercer L. F. y Hitt J. C. 1979. Influence of female copulatory behavior on the induction of pseudopregnancy in the female rat. *Physiology and Behavior*. 22:675-678.
- Gomendio M. 2002. Competición espermática. En Manuel Sole (Eds.): *Evolución, la base de la biología*. Proyecto Sur de Ediciones, S.L. España. Pp.261-269.
- Gomendio M., Harcourt A. H. y Roldan E. R. S. 1998. Sperm competition in mammals. In *Sperm competition and sexual selection*. T. R. Birkhead, & A. P. Moller (Eds.). London, UK: Academic Press. Pp. 667-751.
- Gómez-Montoto L., Magaña C., Tourmente M., Martín-Coello J., Crespo C., Luque-Larena J. J., Gomendio M., Roldan E. R. 2011. Sperm competition, sperm numbers and sperm quality in Muroid Rodents. *PLoS One*. 6:1-10.
- Hart B. L. 1983. Role of testosterone secretion and penile reflexes in sexual behavior and sperm competition in male rats: a theoretical contribution. *Physiology and Behavior*. 31:823-827.
- Hlinak Z. 1990. Precopulatory behaviour in male rats: ethological analysis and functional consideration. *Activitas Nervosa Superior*. 32:12-34.
- Hooper E. T. 1960. The glans penis in *Neotoma (Rodentia)* and allied genera. *Occasional Papers of the Museum of Zoology University of Michigan*. 618:1-20.
- Hooper E. T. 1962. The glans penis in *Sigmodon, Sigmomys*, and *Reithrodon (Rodentia Crecitinae)*. *Occasional Paper of the Museum of Zoology University of Michigan*. 625:1-11.
- Komisaruk B. R. y Steinman J. L. 1986. Genital stimulation as a trigger for neuroendocrine and behavioral control of reproduction. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 474:64-75.
- Koyama S. y Kamimura S. 2000. Influence of social dominance and female odor on the sperm activity of male mice. *Physiology and Behavior*. 71:415-422.

Larsson K. 1956. Conditioning and sexual behavior in the male albino rat. Almquist and Wiksell. Stockholm. Pp. 14-35.

Larsson K. 1961. The importance of time for the intromission frequency in the male rat mating behavior. *Scandinavian Journal of Psychology*. 2:149-162.

Larsson K. 1973. Sexual behavior: The results of an interaction. In: *Contemporary sexual behavior: critical issues in 1970s*. (Eds. J. Zubin and J. Money). John Hopkins University Press, Baltimore, Maryland. Pp. 33-51.

Lemaître J. F., Ramm S. A., Hurst J. L. y Stockley P. 2011. Social cues of sperm competition influence accessory reproductive gland size in a promiscuous mammal. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 278:1171-1176.

Lindemann C. B. y Kanous K. 1989. Regulation of Mammalian Sperm Motility. *Archives of Andrology*. 23:1-22

Lucio R. A, Rodríguez-Piedracruz V., Tlachi-López J. L., García-Lorenzana M. y Fernández-Guasti A. 2014. Copulation without seminal expulsion: The consequence of sexual satiation and the Coolidge effect. *Andrology*. 2:450-457.

Lucio R. A. y Gutiérrez-Ospina G. 2006. Competencia espermática: los machos también deciden cuando, cuanto y con quién. *Gaceta de Biomédicas. Órgano Informativo del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM*. 10:12-16.

Lucio R. A. y Tlachi-López J. L. 2008. Análisis de la cópula y el eyaculado de la rata albina (*Rattus norvegicus*). *Manual de Laboratorio*. Universidad Autónoma de Tlaxcala. CONACYT. Editorial Góngora. México. Pp. 45.

Lucio R. A., Manzo J., Martínez-Gómez M., Sachs B. D. y Pacheco P. 1994. Participation of pelvic nerve branches in male rat copulatory behavior. *Physiology and Behavior*. 55:241-246.

Lucio R. A., Tlachi-López J. L., Eguibar J. R. y Agmo A. 2013. Sperm count and sperm motility decrease in old rats. *Physiology and Behavior*. 110-111:73-79.

Madlafousek J. y Hlinak Z. 1977. Sexual behavior of the female laboratory rat: Inventory, patterning and measurement. *Behaviour*. 63:129-174.

Mann T. 1964. *The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract*. Methuen, London. New York. Pp: 493.

Mann T. y Lutwak-Mann C. 1981. Male Reproductive Function and the Composition of Semen: General Considerations. In: *Male Reproductive Function and Semen*. Springer, London.

Matthews M. K. Jr. y Adler N. T. 1977. Facilitative and inhibitory influences of reproductive behavior on sperm transport in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 91:727-41.

Matthews M. K. Jr. y Adler N. T. 1978. Systematic interrelationship of mating, vaginal plug position, and sperm transport in the rat. *Physiology and Behavior*. 20:303-309.

McClintock M. 1974. Sociobiology of reproduction in the Norway rat (*Rattus norvegicus*): Estrous synchrony and the role of the female rat in copulatory behavior. Unpublished Doctoral thesis, Department of Psychology, University of Pennsylvania.

McClintock M. K. 1984. Group mating in the domestic rat as a context for sexual selection: consequences for the analysis of sexual behavior and neuroendocrine responses. *Advances in the Study of Behavior*. 14:2-50.

McClintock M. K. y Adler N. T. 1978. The role of the female during copulation in wild and domestic Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Behaviour*. 67:67-96.

McClintock M. K. y Anisko J. J. 1982. Group mating among Norway rats: I. Sex differences in the pattern and neuroendocrine consequences of copulation. *Animal Behaviour*. 30:398-409.

McClintock M. K., Anisko J. J. y Adler N. T. 1982. Group mating among Norway rat. II. The social dynamics of copulation: Competition, cooperation, and mate choice. *Animal Behaviour*. 30:410-425.

Mendelson S. D. y Gorzalka B. B. 1987. An improved chamber for the observation and analysis of the sexual behavior of the female rat. *Physiology and Behavior*. 39:67-71.

Menge A. C. y Beitner O. 1989. Interrelationship among semen characteristics, antisperm antibodies, and cervical mucus penetration assays in infertile human couples. *Fertility and Sterility*. 51:486-492.

Moller A. P. 1989. Ejaculate quality, testis size and sperm production in mammals. *Functional Ecology*. 3:91-96.

Moore C. L. y Wong L. 1992. Copulatory behavior, reproduction, and sperm competition in two strains of male rats. *Physiology and Behavior*. 51:569-73.

Moralí G. y Beyer C. 1979. Neuroendocrine control of mammalian estrous behavior. En: *Endocrine control of sexual behavior*. C. Beyer (Ed.). Raven Press, New York. Pp. 33-75.

O'Hanlon J. K. y Sachs B. D. 1986. Fertility of mating in rats (*Rattus norvegicus*): contributions of androgen-dependent morphology and actions of the penis. *Behavioral and Neural Biology*. 32:269-73.

Olivier B., Chan J. S. W., Pattij T., De Jong T. R., Oosting R. S., Veening J. G. y Waldinger M. D. 2006. Psychopharmacology of male rat sexual behavior: modeling human sexual dysfunctions? *International Journal of Impotence Research*. 18:S14-S23.

- Paredes R. G. y Vázquez B. 1999. What do female rats like about sex? Paced mating. *Behavioural Brain Research*. 105:117-127.
- Parker G. A. 1970. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biological Reviews*. 45:525-567.
- Parker G. A. 1982. Why are there so many tiny sperm? Sperm competition and the maintenance of two sexes. *Journal of Theoretical Biology*. 96:281-94.
- Parker G. A. 1998. Sperm competition and the evolution of ejaculates: towards a theory base. In: *Sperm Competition and Sexual Selection*. Birkhead, T. R. y Møller, A. P. (Eds.). Academic Press, London. Pp. 3-54.
- Parker G. A., Ball M. A., Stockley P. y Gage M. J. G. 1996. Sperm competition games: individual assessment of sperm competition intensity by group spawners. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*. 263:1291-1297.
- Parker G. A., Ball M. A., Stockley P. y Gage M.J. 1997. Sperm competition games: a prospective analysis of risk assessment. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 264:1793-1802.
- Parker G. A. y Begon M. E. 1993. Sperm competition games: sperm size and number under gametic control. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 253:255-262.
- Pattij T., de Jong T.R., Uitterdijk A., Waldinger M.D., Veening J.G., Cools A.R., van der Graaf P. H. y Olivier B. 2005. Individual differences in male rat ejaculatory behavior: searching for models to study ejaculation disorders. *European Journal of Neuroscience*. 22:724-734.
- Peirce J. T. y Nuttall R. L. 1961. Self-paced behavior in the female rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 54:310-313.
- Pfaus J. G., Smith W. J. y Coopersmith C. B. 1999. Appetitive and consummatory sexual behaviors female rats in bilevel chambers. *Hormones and Behaviour*. 35:224-240.
- Pfeifle J. K. y Edwards D. A. 1983. Midbrain lesions eliminate sexual receptivity but spare sexual motivation in female rats. *Physiology and Behavior*. 31:385-389.
- Pierce J. T. y Nuttall R. L. 1961. Self-paced sexual behavior in the female rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 54:310.
- Pitnick S., Wolfner M. F. y Suarez S. S. 2009. Ejaculate-female and sperm-female interactions. En *Sperm Biology: an Evolutionary Perspective*. Birkhead T. R., Hosken D. J. y Pitnick S (eds). Academic Press, London. Pp. 247-394.

Portillo W., Unda N., Camacho F. J., Sánchez M., Corona R, Arzate D. M., Díaz N. F. y Paredes R. G. 2012. Sexual activity increases the number of newborn cells in the accessory olfactory bulb of male rats. *Frontiers in Neuroanatomy*. 6:1-9.

Pound N. y Gage M. J. G. 2004. Prudent sperm allocation in Norway rats, *Rattus norvegicus*: a mammalian model of adaptive ejaculate adjustment. *Animal Behaviour*. 68:819-823.

Preston B. T. y Stockley P. 2006. The prospect of sexual competition stimulates premature and repeated ejaculation in a mammal. *Current Biology*. 16:R239-241.

Price E. O. 1980. Sexual behaviour and reproductive competition in male wild and domestic Norway rats. *Animal Behaviour*. 28:657-667.

Ramm S. A., Edward D. A., Claydon A. J., Hammond D. E., Brownridge P., Hurst J. L., Beynon R. J. y Stockley P. 2015. Sperm competition risk drives plasticity in seminal fluid composition. *BMC Biology*. 13:87.

Ramm S.A. y Stockley P. 2009. Adaptive plasticity of mammalian sperm production in response to social experience. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 276:745-751.

Sachs B. D. 1982. Role of striated penile muscles in penile reflexes, copulation, and induction of pregnancy in the rat. *Journal of Reproduction and Fertility*. 66:433-443.

Sachs B. D. 1983. Potency and fertility: hormonal and mechanical causes and effects of penile actions in rats. In *Hormones and Behaviour in Higher Vertebrates* (Balthazart, J. Pröve, E. y Gilles, R., eds). Berlin Springer. Pp. 86-110.

Sachs B. D. y Barfield R. J. 1974. Copulatory behavior of male rats given intermittent electric shocks: Theoretical implications. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 86:607-615.

Sachs B. D. y Garinello L. D. 1980. Hypothetical spinal pacemaker regulating penile reflexes in rats: Evidence from transection of spinal cord and dorsal penile nerves. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 94:530-535.

Sachs B. D., Glater G. B. y O'Hanlon J. K. 1984. Morphology of the erect glans penis in rats under various gonadal hormone conditions. *The Anatomical Record*. 210:45-52.

Schneider-Kofman N. y Sheiner E. 2005. Does stress effect male infertility? -A debate. *Medical Science Monitor*. 11:SR11-13.

Setchell B. P., Maddocks S. y Brooks D. E. 1994. Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract. En *The Physiology of Reproduction*. Knobil y Neill J. D. (eds) Raven Press, New York. Pp. 1063-1177.

Schoelch-Krieger M. S., Orr D. y Perrin T. 1976. Temporal patterning of sexual behavior in the female rat. *Behavioral Biology*. 18:379-386.

- Simmons L. W., Craig M., Llorens T., Schinzig M. y Hosken D. 1993. Bush-cricket spermatophores vary in accord with sperm competition and parental investment theory. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 251:183-186.
- Snook R. R. 2005. Sperm in competition: not playing by the numbers. *Trends in Ecology and Evolution*. 20:46-53.
- Stone C. P. y Ferguson L. W. 1940. Temporal relationships in the copulatory acts of adult male rats. *Journal of Comparative Psychology*. 30:419-434.
- Sutter A., Simmons L. W., Lindholm A. K. y Firman R. C. 2016. Function of copulatory plugs in house mice: mating behavior and paternity outcomes of rival males. *Behavioral Ecology*. 27:185-195.
- Telle H. J. 1966. Beitrag zur kenntnis der verhaltensweise von Ratten, vergleichend dargestellt bei *Rattus norvegicus* und *Rattus rattus*. *Zeitschrift für Angewandte Zoologie*. 53:129-197.
- Terkel J. 1986. Neuroendocrinology of coitally and noncoitally induced pseudopregnancy. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 474:76-94.
- Tlachi-López J. L., López A. A., Hoffman K., Velázquez-Moctezuma J., García-Lorenzana M. y Lucio R. A. 2011. Rat dorsal prostate is necessary for vaginal adhesion of the seminal plug and sperm motility in the uterine horns. *Biological Research*. 44:259-267.
- Tlachi-López, J. L., Eguibar J. R., Fernández-Guasti A., y Lucio R. A. 2012. Copulation and ejaculation in male rats under sexual satiety and the Coolidge effect. *Physiology and Behavior*. 106:626-630.
- Turner E. y Montgomerie R. 2002. Ovarian fluid enhances sperm movement in Arctic charr. *Journal of Fish Biology*. 60:1570-1579.
- Usselman M. C. y Cone R. A. 1983. Rat sperm are mechanically immobilized in the caudal epididymis by “immobilin”, a high molecular weight glyco-protein. *Biology of Reproduction*. 29:1241-1253.
- Vega-Matuszczyk J. y Larsson K. 1991. Role of androgen, estrogen and sexual experience on the female rat's partner preference. *Physiology and Behavior*. 50:139-142.
- Voss R. S. 1979. Male accessory glands and the evolution of copulatory plugs in rodents. *Occasional Papers University of Michigan Museum of Zoology*. 689:1-27.
- Wallach S. J. R. y Hart B. 1983. The role of the striated penile muscles of the male rat in seminal plug dislodgement and deposition. *Physiology and Behavior*. 31:815-821.

Wedell N. y Cook P. A. 1999. Butterflies tailor their ejaculate in response to sperm competition risk and intensity. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences.* 266:1033-1039.

Wedell N., Gage J. G. M. y Parker G. A. 2002. Sperm competition, male prudence and sperm-limited females. *Trends in Ecology and Evolution.* 17:313-320.

Wennemuth G., Meinhardt A., Mallidis C., Albrecht M., Krause W., Renneberg H. y Aumueller G. 2001. Assessment of fibronectinas a potential new clinical tool in andrology. *Andrology.* 33:43-46.

Williams-Ashman H.G. 1984. Transglutaminases and the clotting of mammalian seminal fluids. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 58:51-61.

Yoshida M., Kawano N. y Yoshida K. 2008. Control of sperm motility and fertility: Diverse factors and common mechanisms. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 65:3446-457.

Zipse L. R., Brandling-Bennett E. M., Clark A. S. 2000. Paced mating behavior in the naturally cycling and the hormone-treated female rat. *Physiology and Behavior.* 70:205-209.

10. ANEXOS

10.1 Identificación de fenotipos eyaculatorios

Ratas macho ($n = 92$) fueron sometidas a entrenamiento copulatorio para identificar su fenotipo copulatorio. El entrenamiento consistió en que cada animal realizó 6 pruebas copulatorias, es decir, ejecutó 6 series eyaculatorias cada una intercalada por 2 o 3 días de abstinencia sexual. Sin embargo, no todos los machos eyacularon desde su primera prueba del entrenamiento. Así, los machos requirieron de 6 a 11 pruebas copulatorias durante el entrenamiento. Siguiendo esta metodología, se encontraron 83 copuladores (machos que eyacularon durante la mayoría de las pruebas del entrenamiento copulatorio), 6 machos realizaron solo montas con escasas intromisiones y no eyacularon (machos no copuladores), 2 murieron por causas desconocidas después del primer entrenamiento y 1 fue sacrificado por una infección. Los machos copuladores presentaron un amplio rango de latencias eyaculatorias desde los 70 hasta los 1700 s durante los entrenamientos. Se observa que la latencia eyaculatoria de estos animales se distribuyó como un continuo, donde la mayoría de los animales eyacularon entre los 101-400 s y pocos, después de los 700 s (**Figura 14**).

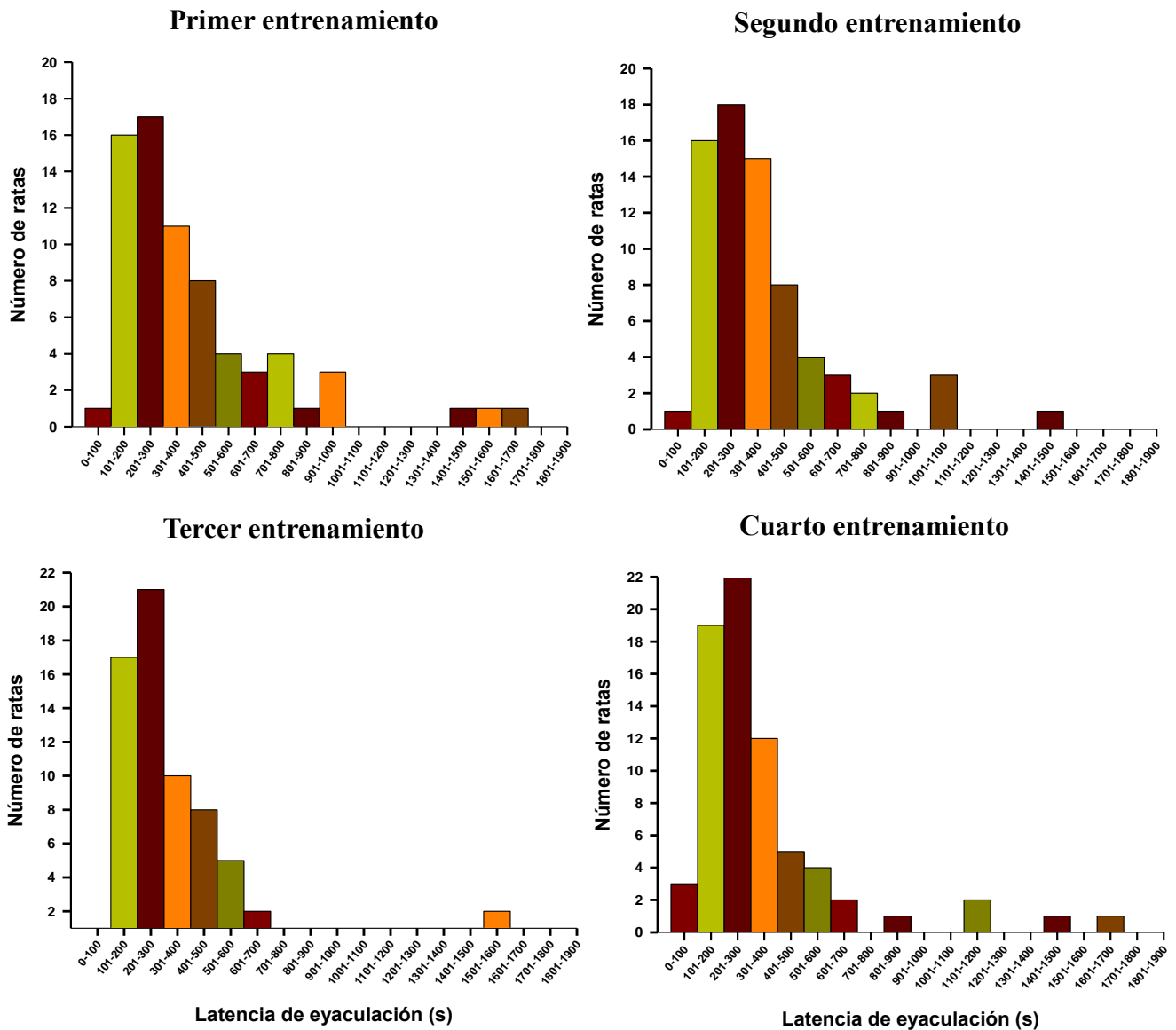


Figura 14. Latencia eyaculatoria de una población de ratas macho. Los histogramas de frecuencia de las últimas cuatro pruebas del entrenamiento copulatorio muestran una distribución sesgada a la izquierda, indicando que la mayoría de los machos tienen latencias eyaculatorias de corta duración entre 101-400 s.

Los machos copuladores mostraron variabilidad tanto en el número de pruebas realizadas (de 4 a 11 pruebas de entrenamiento) durante el entrenamiento copulatorio como en la duración de la latencia eyaculatoria (de 100 hasta 1800 s). Estas variables fueron consideradas para la clasificación de los machos según sus fenotipos eyaculatorios. El fenotipo copulatorio fue

determinado al promediar la duración de la latencia eyaculatoria de las últimas cuatro pruebas) del entrenamiento copulatorio. De este modo, en la población de estudio, sólo encontramos machos de fenotipo copulatorio rápido ($n = 56$) y normal ($n = 22$). No se encontraron machos de fenotipo lento probablemente porque el tamaño de la muestra es pequeño.

10.1.1 Machos de fenotipo copulatorio rápido

La mayoría de los machos de fenotipo copulatorio rápido (88.8%) sólo necesitaron de 6 pruebas de entrenamiento para determinar su fenotipo, ya que eyacularon desde la primera prueba del entrenamiento. El resto de los machos (11.2%), requirieron de 8 pruebas de entrenamiento porque eyacularon por primera vez a partir de la segunda o tercera prueba.

El 68.8% de los machos rápidos manifestaron su latencia eyaculatoria desde la primera prueba y la mantuvieron en las subsecuentes pruebas (el valor de la latencia eyaculatoria en pruebas sucesivas no varió drásticamente durante las seis pruebas del entrenamiento sino que se mantuvo en valores similares); el resto la mantuvieron desde la tercera o quinta prueba (31.2%, **Figura 15 A-D**). Aparentemente, todos los machos rápidos eyacularon entre 200-400 s una vez que su latencia eyaculatoria se estabiliza. Para corroborar el mantenimiento en la duración de la latencia eyaculatoria de los machos rápidos éstas fueron comparadas en las últimas cuatro pruebas del entrenamiento. No hubo diferencias significativas independientemente de si la latencia se estabilizó durante la primera, segunda, tercera o quinta prueba del entrenamiento (**Figura 16**). La latencia eyaculatoria promedio de los últimos cuatro entrenamientos de los machos rápidos fue de 250.25 ± 16.86 s.

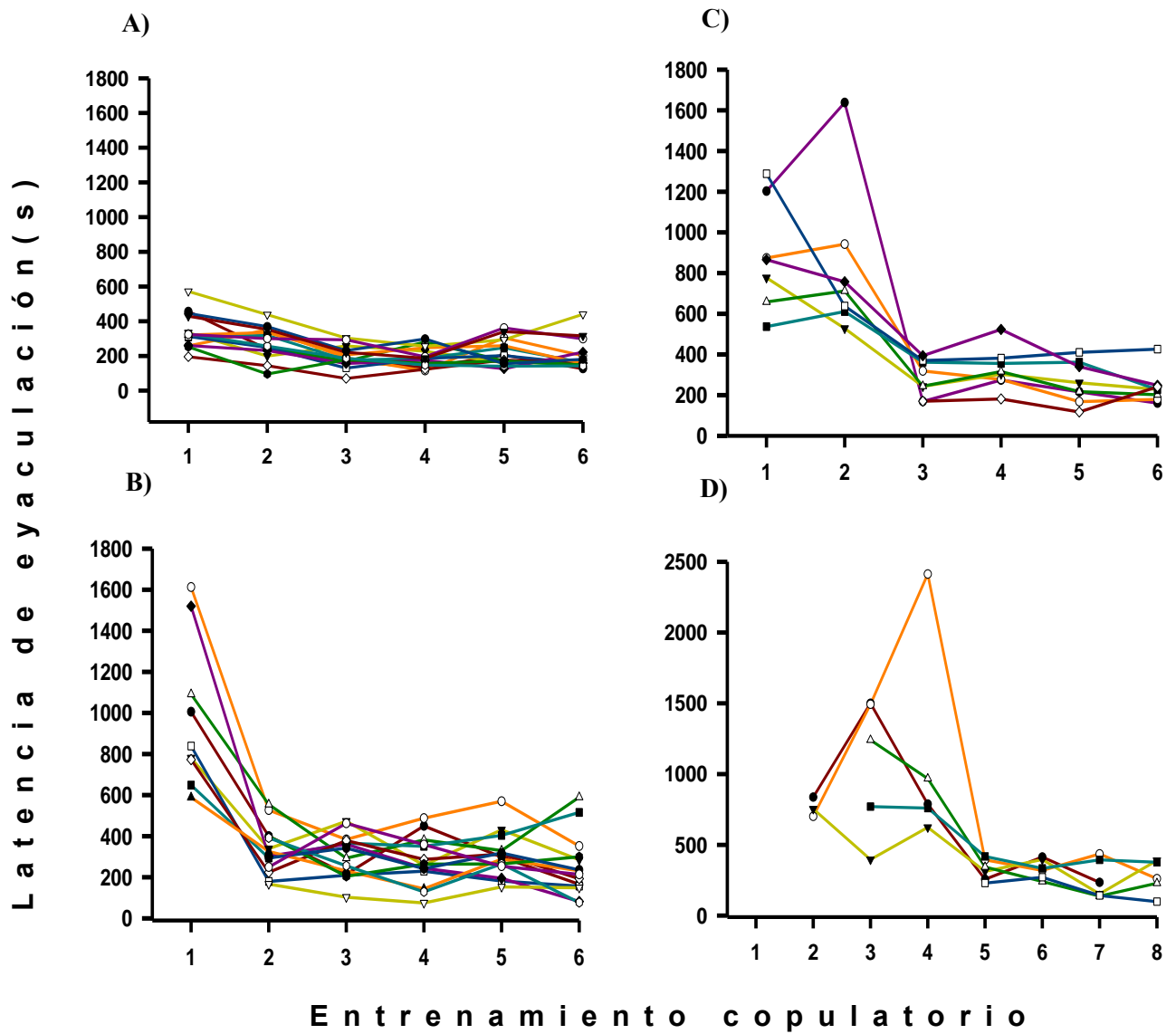


Figura 15. Pruebas del entrenamiento copulatorio de machos de fenotipo rápido. Machos que manifiestan su latencia eyaculatoria desde la primera (A), segunda (B), tercera (C) o quinta prueba del entrenamiento copulatorio (D). Una vez manifestada la latencia se mantiene en las subsiguientes pruebas del entrenamiento.

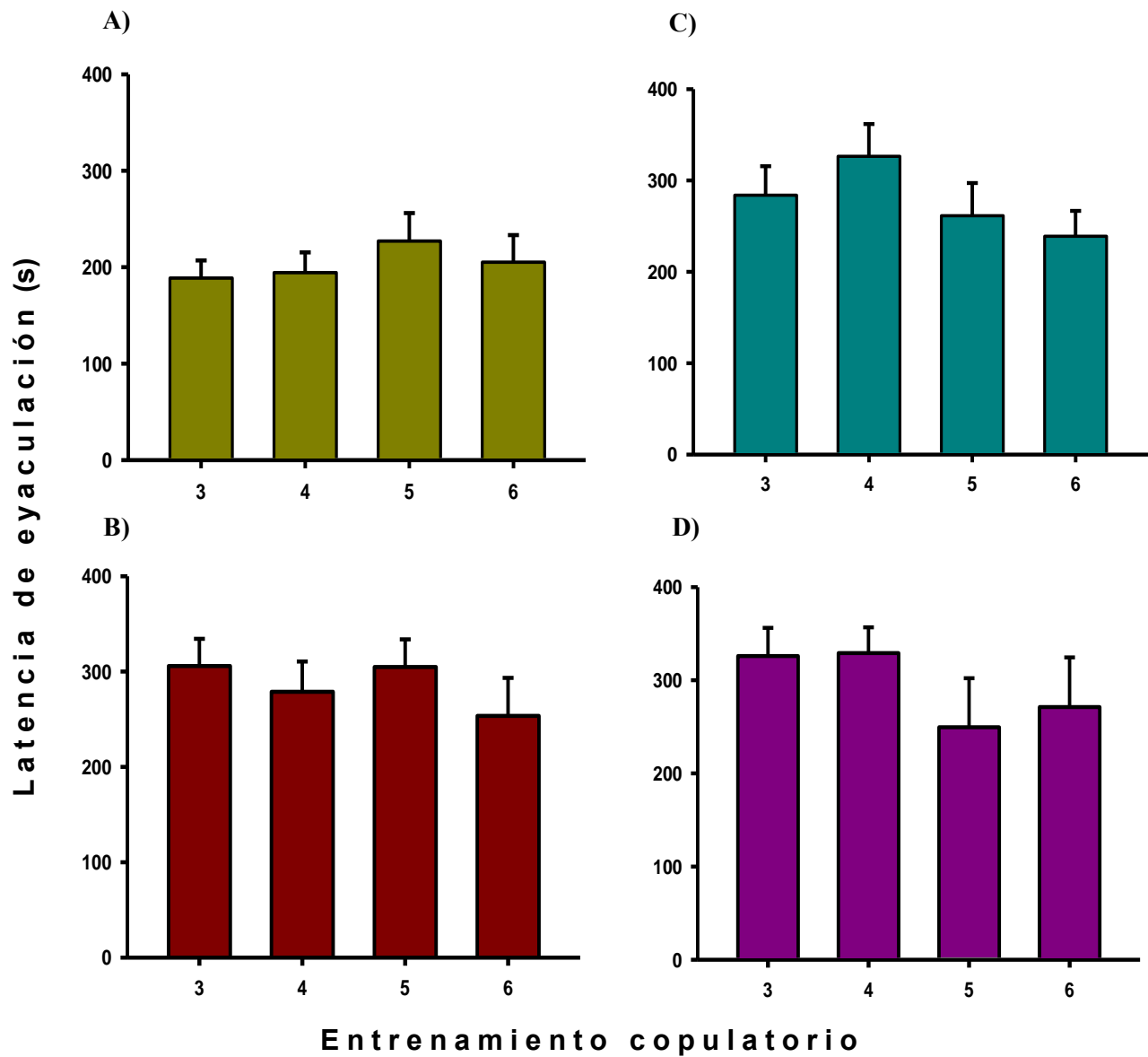


Figura 16. Latencia eyaculatoria de las últimas cuatro pruebas del entrenamiento copulatorio de eyaculadores rápidos. Estos machos mantuvieron su latencia eyaculatoria constante, ya que no se encontraron diferencias significativas entre las últimas cuatro pruebas del entrenamiento, independientemente de si la latencia se estabilizaba desde la primera (A), segunda (B), tercera (C) o quinta prueba (D). * $p < 0.05$, Kruskal Wallis.

10.1.2 Machos de fenotipo copulatorio normal

La mayoría de los machos de fenotipo copulatorio normal (90%) necesitaron hasta 11 pruebas de entrenamiento copulatorio para determinar su fenotipo debido, por un lado, a que no eyaculan en las primeras pruebas del entrenamiento y, por el otro, a la inestabilidad de su latencia eyaculatoria. Así, independientemente de que los machos eyaculen o no en las primeras pruebas del entrenamiento, su latencia eyaculatoria es variable (**Figura 17**). Es importante resaltar que, al igual que en los machos de fenotipo rápido, una vez expresado el patrón eyaculatorio se siguió presentando durante el entrenamiento. La latencia eyaculatoria de los machos normales varió drásticamente durante las seis o más pruebas del entrenamiento desde los 100 hasta los 2500 s, **Figura 17**). No obstante, no se encontraron diferencias significativas en la latencia eyaculatoria promedio de los machos durante los últimos cuatro entrenamientos (**Figura 18**). La latencia eyaculatoria promedio de los últimos cuatro entrenamientos de los machos normales fue de 686.28 ± 96.79 s.

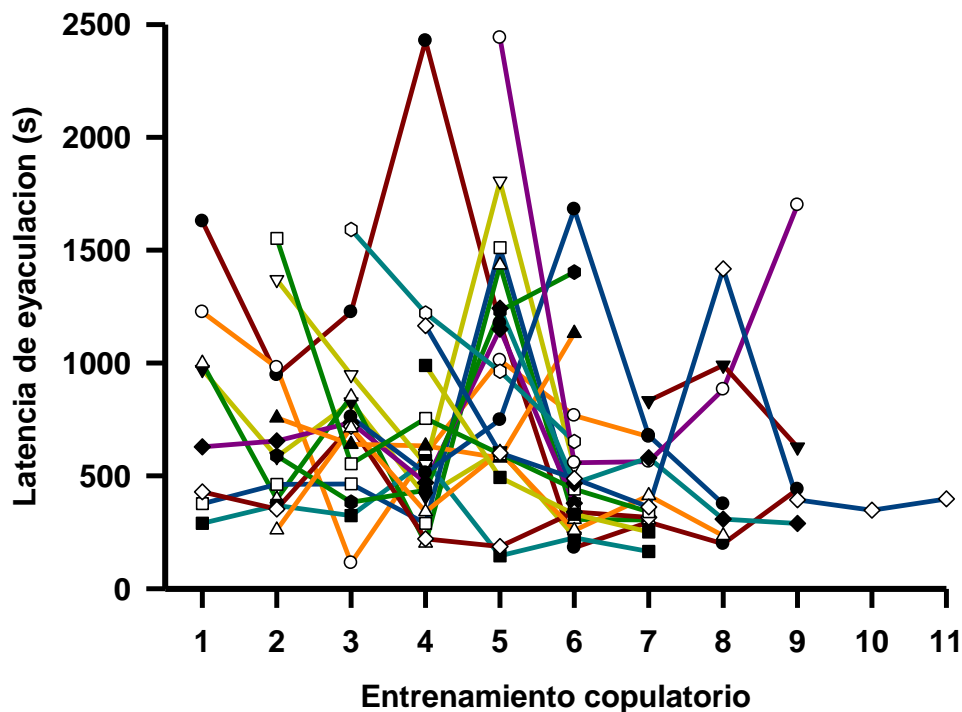


Figura 17. Pruebas del entrenamiento copulatorio de machos de fenotipo normal. Machos que presentan mucha variabilidad en su latencia eyaculatoria durante todo el entrenamiento

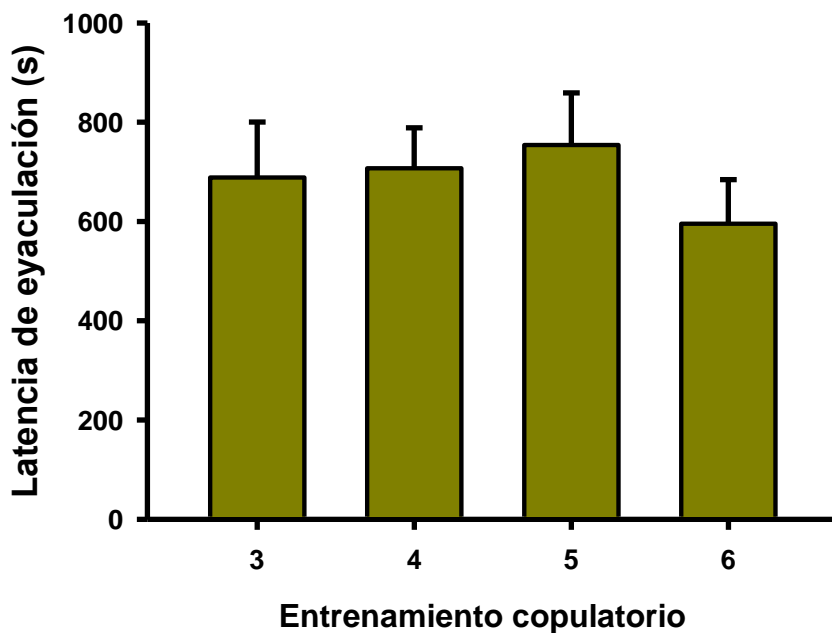


Figura 18. Latencia de eyaculación de las últimas cuatro pruebas del entrenamiento copulatorio de machos de fenotipo normal. Los machos no muestran diferencia significativa en la latencia eyaculatoria de las últimas cuatro pruebas del entrenamiento copulatorios. * $p < 0.05$, Kruskal Wallis.

Finalmente, se obtuvieron machos donde el patrón eyaculatorio no se presentó con regularidad desde el primer entrenamiento, es decir, algunas veces eyacularon pero otras veces no y por lo tanto no se pudo determinar su latencia eyaculatoria ni su fenotipo porque no contaron con cuatro pruebas eyaculatorias consecutivas. Estos machos fueron excluidos de los experimentos.

10.2 Hoja de registro de la conducta sexual masculina

Macho: 1 Condición: Intacto Prueba: Primera prueba del entrenamiento
 Fecha: 4 de Mayo del 2016 Hora: 2:06 pm Observador: María Reyna Fuentes

Tiempo en minutos

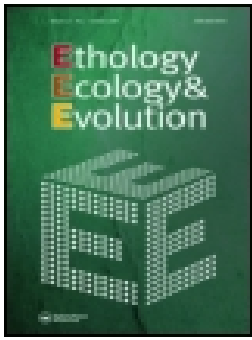
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
 10 s	 18 s			 ▲ 26 s						
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43

Número de montas (NM): 5
 Número de intromisiones (NI): 9
 Intervalo inter-intromisión (III= LE/NI): 248 s/9= 27.55 s

Latencia de monta (LM): 10 s
 Latencia de intromisión (LI): 60 s +18 s= 78 s
 Latencia de eyaculación (LE):42 s+60 s+60s + 26 s= 248 s

Observaciones: _____

11. ARTÍCULOS Y CAPÍTULOS PUBLICADOS



Rats ejaculate prematurely and increase the sperm output during competitive mating

Maria R. Fuentes-Morales, Gabriel Gutiérrez-Ospina, Alonso Fernández-Guasti, Yolanda Cruz & Rosa Angélica Lucio

To cite this article: Maria R. Fuentes-Morales, Gabriel Gutiérrez-Ospina, Alonso Fernández-Guasti, Yolanda Cruz & Rosa Angélica Lucio (2020): Rats ejaculate prematurely and increase the sperm output during competitive mating, *Ethology Ecology & Evolution*, DOI: [10.1080/03949370.2020.1715488](https://doi.org/10.1080/03949370.2020.1715488)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/03949370.2020.1715488>



Published online: 12 Feb 2020.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 8



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Rats ejaculate prematurely and increase the sperm output during competitive mating

MARIA R. FUENTES-MORALES^{1,2}, GABRIEL GUTIÉRREZ-OSPINA³,
ALONSO FERNÁNDEZ-GUASTI⁴, YOLANDA CRUZ² and ROSA ANGÉLICA LUCIO^{2,*}

¹*Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, Ciudad de México, CP 04510, México*

²*Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Carretera Tlaxcala-Puebla km 1.5 s/n, Loma Xicoténcatl, Tlaxcala, Tlax., CP 90062, México*

³*Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas and Coordinación de Psicobiología y Neurociencias, Facultad de Psicología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, CP 04510, México*

⁴*Departamento de Farmacobiología, CINVESTAV-Sede Sur, México, D.F., México*

Received 23 September 2019, accepted 1 January 2020

Rats are gregarious and promiscuous and when a female enters the behavioral estrous, two or more males copulate alternately (mount, intromission or ejaculation are performed by any of them). This circumstance promotes male-male competition that in turns influences the copulatory behavior. Thus, olfactory and visual cues of rivals, in laboratory conditions, shorten the ejaculation latency. Other studies focusing in the presence of a rival found the increment in the sperm number. Until now it is unknown if the simultaneous presence of two males simultaneously influences the copulatory performance and seminal characteristics. Thus, the aim of the present work was to evaluate if sexual competition modifies the copulatory behavior, the sperm number and seminal plug. Sexually experienced Wistar rats were tested in two different copulatory contexts. Non-competitive mating (one male-one female), and competitive mating (two males-one female). The copulatory (mounts, intromissions and ejaculation) and seminal parameters (sperm count and copulatory plug) were analyzed. We found that under competition, there was a shortening of the ejaculation latency due to the reduction in the inter-intromission interval and in the number of intromissions. Respect to the ejaculate, the sperm number increased drastically but the seminal plug maintain its size and weight characteristics. Therefore, sexual competition in male rats affects copulatory behavior and sperm count but not the seminal plug.

KEY WORDS: copulatory behavior, male competition, prudent sperm allocation, seminal plug, sperm competition, sperm count.

*Corresponding author: Rosa Angélica Lucio, Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Carretera Tlaxcala-Puebla km 1.5 s/n, Loma Xicoténcatl, CP 90062, Tlaxcala, Tlax., México (E-mail: lucioral@yahoo.com.mx).

INTRODUCTION

In natural or semi-natural habitats, it is common for more than one male rat to copulate with a receptive female during the estrus phase of a single reproductive cycle (Barnett 1963; Calhoun 1963; McClintock & Adler 1978). Under this circumstance, male rats do not physically fight between them (Barnett 1963; Robitaille & Bovet 1976; Chu & Agmo 2019); instead, they copulate alternately with different females (McClintock et al. 1982). Then, the males ejaculate temporally overlaps in the female's reproductive tract given rise to sperm competition (Parker 1970).

Male rat copulatory behavior include the execution of mounts and intromissions that precede ejaculation (Larsson 1956; Lucio & Tlachi-López 2008). Upon ejaculation, spermatozoa are followed by the secretions of the accessory sexual glands (seminal plasma), which coagulate within the vagina to form the seminal plug (Blandau 1945; Matthews & Adler 1977). It is known that rival males can dislodge the copulatory plug by performing three or four intromissions (Adler & Zoloth 1970; Lucio et al. 1994) thus promoting sperm competition.

Copulatory competition among males shapes sexual behavior strategies. For example, house mice ejaculate prematurely in the presence of visual, auditory and olfactory cues of rivals (Preston & Stockley 2006). Male rats shorten their ejaculation latency and decrease the number of intromissions when copulating in a two males-one female situation compared with a one male-one female condition (Dewsbury & Hartung 1980).

On the other hand, sexual competition not only influences copulatory behavior but also the ejaculate expenditure. Indeed, the sperm competition theory indicates that males have developed strategies to allocate the ejaculate depending upon the number of competitors to reduce the probability of wasting reproductive resources (Parker 1970; Parker et al. 1996; Dixson & Anderson 2004). Accordingly, male meadow voles increase the sperm investment when they mate in the presence of another male's odors (del Barco-Trillo & Ferkin 2004). Male rats during a competition context (a male accompanied by a rival that observed the copulation behind a screen, preventing physical contact) ejaculated significantly more sperm than when copulating alone with the female (Pound & Gage 2004).

Sperm competition not only influence the number of ejaculated spermatozoa. Recent studies have suggested that the seminal plasma components are also modified by competition (Ramm et al. 2015) leading to altered copulatory plugs. This is important in the case of rats because the seminal plug facilitates the transcervical sperm transport (Matthews & Adler 1978; Tlachi-López et al. 2011; Sutter et al. 2016).

It has been proposed that copulatory plugs increase or at least maintain their size during a competitive context (Simmons 2001). In fact, in the house mouse, the copulatory plug maintain the size in response to the sensory cues of rival males during mating (Ramm & Stockley 2007).

All these data suggest that mating under competition conditions affects copulatory behavior and the seminal and plug characteristics; however, no study has systematically analyzed these changes. Thus, the aim of this study was to analyze the copulatory behavior, sperm count and physical features of the seminal plug under competing (two males-one female) and non-competing (one male-one female) mating.

METHODS

Animals

Wistar rats were used. Males were housed individually in acrylic cages (37 × 27 × 15 cm) from postnatal day 60 to the last day of the experiments. Ovariectomized females were housed in groups of 4–5 per cage (47 × 32 × 20 cm). All animals were maintained in temperature (20 ± 2 °C) and humidity (40%) controlled rooms under reversed light/dark cycles (12/12 hr, lights off 08:00). Rats were fed with commercial pellets (Purina Chow, Mexico) and water ad libitum.

Sexual behavior training tests

Sexually mature naïve male rats were tested during six copulatory encounters to acquire sexual experience. Each copulatory test took place 3 to 4 days apart. Copulatory encounters were conducted under dim red light during the second third of the dark phase using acrylic mating arenas (diameter = 60 cm, height = 60 cm). The floor (wood shavings) of the mating arena was changed before each copulatory encounter. Males were habituated for 5 min; after, an ovariectomized estrous female was introduced into the mating arena. Estrous was induced by subcutaneously administering estradiol benzoate (10 µg in olive oil; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) followed by progesterone (2 mg dissolved in olive oil; Sigma-Aldrich) 48 and 4 hr, respectively, before each test (Zipse et al. 2000; Lucio & Tlachi-López 2008; Lucio et al. 2014).

Only males that displayed the ejaculatory pattern in at least the last four copulatory training tests were classified as sexually experienced. Male rats that did not fulfilled this criterion were disregarded. Once males were identified as sexually experienced, they were evaluated under either copulatory context.

Non-competitive and competitive matings

Sexually experienced male rats were randomly selected to participate in non-competitive or competitive matings. To guarantee that the behavioral differences depended on sexual competition -and not on behavioral variability- we selected males that behaved similarly before copulating under the two different mating contexts. Thus, male rats included in the non-competitive mating- and the competitive mating-groups showed similar values in their copulatory and seminal parameters in the last sexual training test (Table 1).

In the non-competitive context, one male and one sexually receptive female were used. In the competitive mating, two sexually experienced males were exposed simultaneously to a single receptive female. Under this context, the male that ejaculated first was the winner competitor, and that did not ejaculate was the loser competitor. The copulatory and seminal parameters were registered under non-competitive mating (n = 14), and competitive mating (n = 22 plus other 22 males classified as loser competitors).

Copulatory parameters

The copulatory parameters registered were mount latency (time in sec from the introduction of the female to the first mount), intromission latency (time in sec from the introduction of the female to the first intromission), ejaculation latency (time in sec from the first intromission to ejaculation), number of mounts, and number of intromissions. In addition, the inter-intromission interval was calculated by dividing the ejaculation latency/number of intromissions (Larsson 1956).

Table 1.
Copulatory and seminal parameters of males during the last test of sexual training.

Parameters	Last test of sexual training of males used in non-competitive mating (n = 14)	Last test of sexual training of males used in competitive mating (n = 44)	P value
Copulatory			
Mount latency (sec)	9.5 (5–44)	7 (5–9)	0.26
Intromission latency (sec)	14.5 (6–36)	13 (9–16)	0.86
Ejaculation latency (sec)	400 (245–668)	467 (252–756.5)	0.47
Number of mounts	6.5 (4–12)	9 (6–15)	0.06
Number of intromissions	10.5 (9–16)	11 (8.5–13)	0.49
Inter-intromission interval (sec)	28.08 (23–42.93)	42.9 (31–60.79)	0.12
Seminal			
Sperm count (10 ⁶)	52 (30–60)	54 (37.5–98.5)	0.17
Seminal plug weight (mm)	104 (90–125)	96.3–114.2)	0.77
Seminal plug length (mm)	9.9 (9.5–11)	10.05 (10.05–11.35)	0.08
Seminal plug width (mm)	5.2 (5–6)	5.4 (5.2–6)	0.56

Data are expressed as median (q1–q3).

During competitive mating, the copulatory parameters of both males were registered. However, only the data of the male that performed the ejaculation pattern were considered for the statistical analyses.

Semen obtained from the uterine horns and sperm count

Once the behavioral ejaculation pattern was observed, the female was left in the mating arena during 5 min to avoid interrupting the transcervical sperm transport (Matthews & Adler 1977, 1978). Subsequently, the female was anesthetized with sodium pentobarbital (26 mg/kg via intraperitoneal; Pfizer, Mexico) and its uterine horns were exposed through an abdominal incision. The tied uterus proximally and distally was excised from the abdominal cavity. Afterwards, the uterine horns were immersed in a Petri dish filled with physiological saline at 37 °C. Fat and external blood vessels were peeled off carefully. The uterine horns were removed from the Petri's dish and the excess fluids adsorbed with a filter paper. Lastly, an incision was made at the proximal end of each horn and the content of both uterine horns (semen) was squeezed off, collected into a micro-centrifuge tube, and immediately placed in a thermo-bath at 37 °C (Lucio & Tlachi-López 2008; Lucio et al. 2013).

To evaluate sperm count, a 10 µL sample of seminal fluid was placed onto a microscope glass slide (25 × 75 mm) that was coverslipped (22 × 22 mm). In this sample, the number of spermatozoa was quantified in three random fields to determine the sperm density. Depending on the mean obtained from the three random fields the semen dilution was calculated as follows: 1:100 (semen:diluent) corresponds a mean range of 10–60 spermatozoa; 1:200 to 61–120 spermatozoa; 1:300 to 121–200 spermatozoa, and 1:400 > 200 spermatozoa. Ten µL of diluted semen was pipetted into a Neubauer hemocytometer. The number of spermatozoa in five squares of the

Neubauer's chamber was counted in both grids using a 20 × microscope objective; the values obtained in both grids were averaged and multiplied by 10⁶. Then sperm number is expressed in millions per mL (Lucio & Tlachi-López 2008; Lucio et al. 2013).

Copulatory plug obtained from the vagina and its measurements

Once the fluid content of the uterine horns was obtained females were sacrificed with an intraperitoneal overdose of sodium pentobarbital. An incision was made from the vaginal orifice to the pubis and then was cut the cartilaginous joint of the pubic symphysis. Then, a longitudinal incision was made in the dorsal vaginal wall and the seminal plug was detached from the vaginal walls and from the cervix using a spatula. Weight, using an analytical scale (Mettler AE50, USA), and size (length and width) of the fresh seminal plug were determined using a digital caliper.

Statistical analysis

Because data did not follow a normal distribution, the copulatory and seminal parameters were compared between non-competitive and competitive matings using the Mann-Whitney U test. Data were expressed as median and first quartile-third quartile [median (q1-q3)]. Data were analyzed using a confidence level of 95% ($P < 0.05$).

Statistical measurements were performed using Sigma Plot version 11.0 software for Windows Vista.

RESULTS

The ejaculation latency and the inter-intromission interval were shortened under the competitive mating compared to non-competitive ($P = 0.002$, $P = 0.028$, respectively, Mann Whitney U test; Fig. 1). The number of intromissions was smaller under competitive mating than under non-competitive mating ($P = 0.04$, Mann Whitney U test; Fig. 1).

Mount and intromission latencies did not change during competitive mating [26 (11–48)] sec, and [27.5 (18–75)] sec, respectively vs non-competitive mating [18 (6–129)] sec, and [32 (11–104)] sec, respectively, $P = 0.77$ and $P = 0.84$, Mann-Whitney U test. The number of mounts were similar between males copulating in competitive [4 (2–8)] and non-competitive contexts [7 (3–10)], $P = 0.13$, Mann-Whitney U test.

It is worth mentioning that under competitive mating, 73% of males did not ejaculate (loser males), but performed mounts and intromissions; the remaining 27% did not show masculine sexual behavior. This indicates that the presence and sexual activity of the competitor male influences the copulatory behavior of the male that ejaculated.

The sperm count increased in those males that copulated in the competition context (Fig. 2), while the seminal plug weight was similar between non-competitive and competitive matings (Fig. 2). The width and length of the seminal plug did not change during competitive mating [5.45 (5.2–6)] mm, and [10.8 (10.4–11.4)] mm, respectively as compared with the non-competitive mating [5.20 (5–6)] mm, and [9.95 (9.5–11)] mm, respectively, $P = 0.42$ and $P = 0.057$, respectively, Mann-Whitney U test.

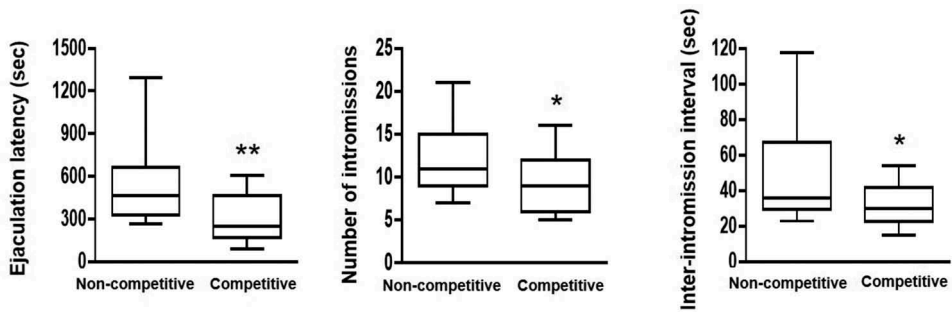


Fig. 1. — Copulatory parameters. Male rats ejaculated with shorter ejaculation latencies and had a reduced number of intromissions and inter-intromission intervals during competitive mating.

DISCUSSION

The presence of a rival during mating shortened the ejaculation latency. This result agrees with that obtained in the wild house mouse using sensory cues of rivals (Preston & Stockley 2006). In addition, our results are in concordance with findings in laboratory rats using male rivals. Thus, Long Evans and F344 rats had shortened ejaculation latencies when exposed to male competition (two-males and one-female; Dewsbury & Hartung 1980). Therefore, the potential rival and the physical competition reduced the ejaculation latency possibly because both conditions represent social stressors that may produce changes in the sexual behavior, specifically by reducing the ejaculation latency and the number of intromissions (Fernández-Guasti et al. 1990, 1991). Possibly, during competitive mating, males may experience anxiety-like behaviors that result in shorter ejaculation latencies due to the reduction in the inter-intromission interval and the number of intromissions. Interestingly, against these findings, a recent study has reported that copulatory behavior in a multiple male condition (three-males and one-female) was unmodified compared to copulation in

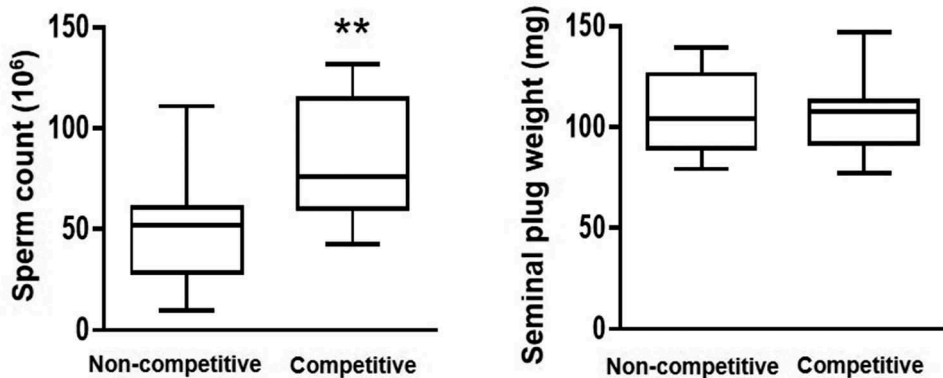


Fig. 2. — Seminal parameters. Male rats showed an increased sperm count, but their seminal plug weight was unaffected by competitive mating.

a single mating condition (one-male and one-female; Chu & Agmo 2019). This finding, together with present results, suggests that copulatory behavior is modified according to the number of competitors. In support, it is known that competition between two males increases the sperm number, while when the number of rivals increases to more than two the sperm expenditure reduces (Parker et al. 1996). Thus, it is possible that male sexual behavior, as sperm expenditure, vary according to the number of competitors.

In line with previous data (del Barco-Trillo & Ferkin 2004; Pound & Gage 2004), the present results indicated that the sperm output was increased in the competitive mating condition respect to non-competitive matings. However, in those studies there was no physical contact between males. Therefore, the present work is the first to demonstrate the prediction of the sperm competition theory during physical contact between males. These findings permit to generalize that the presence of a rival or the simple exposition to its sensory cues increase the sperm number as predicted by the sperm competition theory. The increment in the sperm number in response to the competitive context can be due to changes in the contractility of the vas deferens (Baker & Bellis 1994). Contractions of the distal portion of the duct are essential for sperm delivery (Batra 1974; Guha et al. 1975; Hib et al. 1982). Social stressors modulate the secretion of endogenous opioids that can interact with μ -receptors of the vas deferens; thus, it has been suggested that male competition in the deer mouse affects the circulating levels of endogenous opioids then controlling the contractility of the vas deferens allowing sperm delivery under polyandrous mating conditions (Pound 1999). On these bases, it is possible that competitive mating for male rats modifies the vas deferens contractility by μ -receptors, promoting the insemination of more sperm. In addition, it has been proposed an enhanced contraction of the epididymal cauda to mobilize more sperm during competition in the meadow vole (del Barco-Trillo & Ferkin 2004, 2007). Finally, in the present study, the copulatory plug size and weight were unaffected by competition, indicating that in male rats there is a lack of adjustment in the amount of seminal plasma dedicated to plug formation as occurs in the house mice (Ramm & Stockley 2007).

In conclusion, competitive mating in rats produces a shortening in the ejaculation latency, an increase in the sperm count and a lack of effect in the amount of seminal plasma involved in the copulatory plug formation. Our results suggest that competitive sexual encounters provoke mild anxiety-like responses resulting in a premature ejaculation, and a larger number of expelled spermatozoa. Thus, competition in male rats fulfill the prediction of the sperm competition theory.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the “Posgrado en Ciencias Biológicas” of the UNAM for the training received during the Doctorate studies and the Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta where the experiments were carried out. The article is a requirement for obtaining the degree of Doctor of Biological Sciences. G. Gutiérrez-Ospina thanks Jesús Ramírez-Santos and Margarita Gómez-Chavarrín for technical and administrative support.

DISCLOSURE STATEMENT

No potential conflict of interest was reported by the authors.

FUNDING

This work was partially supported by CONACYT [grant 105502, R.A. Lucio], DGAPA-PAPIIT-UNAM [grant IN215208, G. Gutiérrez-Ospina, R.A. Lucio]. M.R. Fuentes-Morales received a fellowship from CONACYT [400424].

ETHICAL STANDARD

The experimental protocols were revised and approved by the local Committee on Laboratory Animals, and were carried out in full compliance with the guidelines of the Mexican Council on Laboratory Animals' Care (NOM-062-Z00-1999).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.R. Fuentes-Morales performed experiments, analyzed data statistically, and helped write the manuscript; G. Gutiérrez-Ospina supervised the study and wrote the manuscript; A. Fernández-Guasti interpreted data and reviewed the manuscript; Y. Cruz reviewed the manuscript; and R.A. Lucio designed and supervised the study, interpreted data, and wrote the manuscript.

REFERENCES

- Adler NT, Zoloth SR. 1970. Copulatory behavior can inhibit pregnancy in female rats. *Science*. 168:1480–1482. doi:[10.1126/science.168.3938.1480](https://doi.org/10.1126/science.168.3938.1480)
- Baker RR, Bellis MA. 1994. Human sperm competition: copulation, masturbation and infidelity. London (UK): Chapman and Hall.
- Barnett SA. 1963. The rat: a study in behavior. Chicago (IL): Aldine Publishing Company.
- Batra SK. 1974. Sperm transport through the vas deferens: review of hypothesis and suggestions for a quantitative model. *Fertil Steril*. 25:186–202. doi:[10.1016/S0015-0282\(16\)40220-7](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)40220-7)
- Blandau RJ. 1945. Is the copulation plug necessary for the en masse transport of spermatozoa into the uterine cornua of the albino rat? *Anat Rec*. 91:266–267.
- Calhoun JB. 1963. The ecology and sociology of the Norway rat. Bethesda (MD): Public Health Service.
- Chu X, Agmo A. 2019. Behavioral response is absent under the mating competition in rats (*Rattus norvegicus*). *Physiol Behav*. 201:184–190. doi:[10.1016/j.physbeh.2019.01.010](https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.01.010)
- del Barco-Trillo J, Ferkin MH. 2004. Male mammals respond to a risk of sperm competition conveyed by odours of conspecific males. *Nature*. 431:446–449. doi:[10.1038/nature02845](https://doi.org/10.1038/nature02845)
- del Barco-Trillo J, Ferkin MH. 2007. Increased sperm number in the vas deferens of meadow voles, *Microtus pennsylvanicus*, in response to odors of conspecific males. *Behav Ecol Sociobiol*. 61:1759–1764. doi:[10.1007/s00265-007-0408-0](https://doi.org/10.1007/s00265-007-0408-0)
- Dewsbury DA, Hartung TG. 1980. Copulatory behaviour and differential reproduction of laboratory rats in a two-male, one-female competitive situation. *Anim Behav*. 28:95–102. doi:[10.1016/S0003-3472\(80\)80012-1](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(80)80012-1)
- Dixon AF, Anderson MJ. 2004. Sexual behavior reproductive physiology and sperm competition in male mammals. *Physiol Behav*. 83:361–371. doi:[10.1016/j.physbeh.2004.08.022](https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.08.022)
- Fernández-Guasti A, Roldán-Roldán G, Larsson K. 1991. Anxiolytics reverse the acceleration of ejaculation resulting from enforced intercopulatory intervals in rats. *Behav Neurosci*. 105:230–240. doi:[10.1037/0735-7044.105.2.230](https://doi.org/10.1037/0735-7044.105.2.230)

- Fernández-Guasti A, Roldán-Roldán G, Saldívar A. 1990. Pharmacological manipulation of anxiety and male rat sexual behavior. *Pharmacol Biochem Behav.* 35:263–267. doi:[10.1016/0091-3057\(90\)90237-C](https://doi.org/10.1016/0091-3057(90)90237-C)
- Guha SK, Kaur H, Ahmed AM. 1975. Mechanisms of spermatid fluid transport in the vas deferens. *Med Biol Eng.* 13:518–522. doi:[10.1007/BF02477128](https://doi.org/10.1007/BF02477128)
- Hib J, Ponzio R, Vilar O. 1982. Contractility of the rat cauda epididymis and vas deferens during seminal emission. *Reprod Fertil.* 66:47–50. doi:[10.1530/jrf.0.0660047](https://doi.org/10.1530/jrf.0.0660047)
- Larsson K. 1956. Conditioning and sexual behavior in the male albino rat. Stockholm (SE): Almqvist and Wiksell.
- Lucio RA, Manzo J, Martínez-Gómez M, Sachs BD, Pacheco P. 1994. Participation of pelvic nerve branches in lame rat copulatory behavior. *Physiol Behav.* 55:241–246. doi:[10.1016/0031-9384\(94\)90129-5](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90129-5)
- Lucio RA, Rodríguez-Piedracruz V, Tlachi-López JL, García-Lorenzana M, Fernández-Guasti A. 2014. Copulation without seminal expulsion: the consequence of sexual satiation and the Coolidge effect. *Andrology.* 2:450–457. doi:[10.1111/j.2047-2927.2014.00209.x](https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2014.00209.x)
- Lucio RA, Tlachi-López JL. 2008. Análisis de la cópula y el eyaculado de la rata albina (*Rattus norvegicus*): manual de laboratorio [Analysis of copulatory behavior and ejaculate of the albino rat (*Rattus norvegicus*): laboratory manual]. México (MX): Góngora Ediciones. Spanish.
- Lucio RA, Tlachi-López JL, Eguibar JR, Agmo A. 2013. Sperm count and sperm motility decrease in old rats. *Physiol Behav.* 110-111:73–79. doi:[10.1016/j.physbeh.2012.12.015](https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.12.015)
- Matthews M, Adler NT. 1977. Facilitative and inhibitory influences of reproductive behavior on sperm transport in rats. *J Comp Physiol Psychol.* 91:727–741. doi:[10.1037/h0077364](https://doi.org/10.1037/h0077364)
- Matthews MK, Adler NT. 1978. Systematic interrelationship of mating, vaginal plug position, and sperm transport in the rat. *Physiol Behav.* 20:303–309. doi:[10.1016/0031-9384\(78\)90224-X](https://doi.org/10.1016/0031-9384(78)90224-X)
- McClintock MK, Adler NT. 1978. The role of the female during copulation in wild and domestic Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Behaviour.* 67:67–96. doi:[10.1163/156853978X00260](https://doi.org/10.1163/156853978X00260)
- McClintock MK, Anisko JJ, Adler NT. 1982. Group mating among Norway rat. II. The social dynamics of copulation: competition, cooperation, and mate choice. *Anim Behav.* 30:410–425. doi:[10.1016/S0003-3472\(82\)80052-3](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(82)80052-3)
- Parker GA. 1970. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biol Rev.* 45:525–567. doi:[10.1111/j.1469-185X.1970.tb01176.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1970.tb01176.x)
- Parker GA, Ball MA, Stockley P, Gage MJG. 1996. Sperm competition games: individual assessment of sperm competition intensity by group spawners. *Proc R Soc Lond B.* 263:1291–1297. doi:[10.1098/rspb.1996.0189](https://doi.org/10.1098/rspb.1996.0189)
- Pound N. 1999. Effects of morphine on electrically evoked contractions of the vas deferens in two congeneric rodent species differing in sperm competition intensity. *Proc R Soc Lond B.* 266:1755–1758. doi:[10.1098/rspb.1999.0842](https://doi.org/10.1098/rspb.1999.0842)
- Pound N, Gage MJG. 2004. Prudent sperm allocation in Norway rats, *Rattus norvegicus*: a mammalian model of adaptive ejaculate adjustment. *Anim Behav.* 68:819–823. doi:[10.1016/j.anbehav.2004.02.004](https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2004.02.004)
- Preston BT, Stockley P. 2006. The prospect of sexual competition stimulates premature and repeated ejaculation in a mammal. *Curr Biol.* 16:R239–241. doi:[10.1016/j.cub.2006.03.018](https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.03.018)
- Ramm SA, Edward DA, Claydon AJ, Hammond DE, Brownridge P, Hurst JL, Beynon RJ, Stockley P. 2015. Sperm competition risk drives plasticity in seminal fluid composition. *BMC Biol.* 13:87. doi:[10.1186/s12915-015-0197-2](https://doi.org/10.1186/s12915-015-0197-2)
- Ramm SA, Stockley P. 2007. Ejaculate allocation under varying sperm competition risk in the house mouse, *Mus musculus domesticus*. *Behav Ecol.* 18:491–495. doi:[10.1093/beheco/arm003](https://doi.org/10.1093/beheco/arm003)
- Robitaille JA, Bovey J. 1976. Field observations on the social behavior of the Norway rat (*Rattus norvegicus*). *Biol Behav.* 1:289–308.
- Simmons LW. 2001. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. Princeton (NJ): Princeton University Press.

- Sutter A, Simmons LW, Lindholm AK, Firman RC. 2016. Function of copulatory plugs in house mice: mating behavior and paternity outcomes of rival males. *Behav Ecol.* 27:185–195. doi:[10.1093/beheco/arv138](https://doi.org/10.1093/beheco/arv138)
- Tlachi-López JL, López AA, Hoffman K, Velázquez-Moctezuma J, García-Lorezana M, Lucio RA. 2011. Rat dorsal prostate is necessary for vaginal adhesion of the seminal plug and sperm motility in the uterine horns. *Biol Res.* 44:259–267. doi:[10.4067/S0716-97602011000300007](https://doi.org/10.4067/S0716-97602011000300007)
- Zipse LR, Brandling-Bennett EM, Clark AS. 2000. Paced mating behavior in the naturally cycling and the hormone-treated female rat. *Physiol Behav.* 70:205–209. doi:[10.1016/s0031-9384\(00\)00242-0](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(00)00242-0)

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/347409746>

Threshold for copulation-induced analgesia varies according to the ejaculatory endophenotypes in rats

Article in *International Journal of Impotence Research* · December 2020

DOI: 10.1038/s41443-020-00390-8

CITATIONS

0

READS

37

7 authors, including:



Porfirio Gómora-Arrati

Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute

40 PUBLICATIONS 515 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Barry Komisaruk

Rutgers, The State University of New Jersey

235 PUBLICATIONS 8,536 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Julio Cesar Morales Medina

Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute

63 PUBLICATIONS 1,207 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Antioxidants and aging [View project](#)



A Meta-Analysis Detailing Overall Sexual Function and Orgasmic Function in Women Undergoing Midurethral Sling Surgery for Stress Incontinence [View project](#)



Threshold for copulation-induced analgesia varies according to the ejaculatory endophenotypes in rats

Carlos E. Aguilar-Pérez^{1,2} · Porfirio Gómora-Arrati³ · Barry R. Komisaruk⁴ · Maria Reyna Fuentes-Morales^{2,5} · Julio César Morales-Medina³ · Oscar González-Flores³ · Rosa Angélica Lucio²

Received: 12 March 2020 / Revised: 5 November 2020 / Accepted: 27 November 2020
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Limited 2020

Abstract

Analgesia may be modulated by multiple internal and external factors. In prior studies, copulatory-induced analgesia was demonstrated using the vocalization threshold to tail shock (VTTS) in male and female rats. Three ejaculatory endophenotypes have been characterized in male Wistar rats based upon their ejaculation latency (EL). Since intromissions and ejaculations produce analgesia, and these copulatory patterns are performed with different frequency depending on the male's ejaculatory endophenotype, we hypothesized that copulation-induced analgesia would vary in relation to these endophenotypes. In the present study, we used three groups according to the EL (medians): rapid ejaculators (236 s; $n = 21$), intermediate ejaculators (663.2 s; $n = 20$) and sluggish ejaculators (1582.2 s; $n = 8$). Our aim was to evaluate whether copulation-induced analgesia is related to the ejaculatory endophenotypes during two consecutive ejaculatory series (EJS). In the first EJS, the VTTS of the rapid ejaculators was significantly higher than that of intermediate and sluggish rats. At the onset of the second EJS, the VTTS of the rapid and intermediate ejaculators was significantly higher than that of the sluggish rats. No differences in VTTS were observed during the first or second post-ejaculatory intervals among the three groups. These findings provide evidence that the more intromissions that occurred per unit time, the higher was the level of analgesia.

Supplementary information The online version of this article (<https://doi.org/10.1038/s41443-020-00390-8>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Rosa Angélica Lucio
lucioral@yahoo.com.mx

¹ Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico

² Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Carretera Tlaxcala-Puebla Km 1.5s/n, Loma Xicoténcatl, CP 90062, Tlaxcala, Tlax, Mexico

³ Centro de Investigación en Reproducción Animal, Carlos Beyer, CINVESTAV-Universidad Autónoma de Tlaxcala, Apdo. Postal 62, Panotla 90140, Mexico

⁴ Department of Psychology, Rutgers University, 101 Warren St., Newark, NJ 07102, USA

⁵ Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, CP 04510 Ciudad de México, Mexico

Introduction

Analgesia may be defined as the attenuation of pain response to nociceptive stimuli [1]. In male rats, analgesia is produced by copulation [2–6]. Intromissions result in a higher level of analgesia than that provided by mounts, i.e., five intromissions produce twice the degree of analgesia as 5 mounts [4], and ejaculation produces triple of analgesia than 5 mounts, persisting during the post-ejaculatory interval [4]. Intromissions represent a higher intensity of sexual stimulation than mounts [7].

Electrical stimulation of flanks [2] or tail [4] produced an audible squeak in response to the tail shock that was attenuated by copulation (one or five intromissions or ejaculation) [4]. Other measures, e.g., an increase in latency to paw-licking during hot-plate exposure immediately after ejaculation, have been used as indicators of analgesia; this effect was not maintained during the postejaculatory interval (PEI) [3]. Another measure of analgesia in rats that has been utilized is the vocalization threshold to tail shock (VTTS), i.e., an elevation in the intensity of electrical current that will elicit an audible vocalization. VTTS increased

during copulation and after ejaculation [4]. VTTS increased further during a second ejaculatory series [4].

Male rats can be characterized as rapid, intermediate, and sluggish ejaculators depending on the number of mounts, ejaculation latency, and number of ejaculations per unit time [8, 9]. Also, they differ in the number of intromissions and in the intromission ratio [10]. “Rapid” ejaculators were found in 10% of rats (4 or 5 ejaculations/30 min), “sluggish” ejaculators were found in another 10% (0 or 1 ejaculation/30 min), and “intermediate” ejaculators comprised 80% of rats (2 or 3 ejaculations/30 min) [8, 9]. Since intromissions and ejaculations produce analgesia [4], and these copulatory patterns are performed with different frequency among ejaculatory endophenotypes [8, 9], we hypothesized that males will have different levels of analgesia depending on their pattern of copulatory activity.

Materials and methods

Animals

Wistar rats (3–4 months of age; 300–350 g body weight) obtained from the Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta vivarium were used. Males ($n = 75$) and females (naive as to sexual behavior experience) were maintained in laboratory conditions in a room with a reversed light–dark cycle (12:12), and controlled temperature (23 ± 2 °C), with food (Purina Chow) and water freely available. Rats were housed two or three per acrylic cage in the vivarium. The cage contained sawdust as bedding. Estrous behavior was induced in ovariectomized rats by subcutaneous administration of estradiol benzoate (10 μ g in olive oil; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) followed by progesterone (2 mg dissolved in olive oil; Sigma-Aldrich) at 48 and 4 h, respectively, before each copulatory test [11, 12]. All procedures described in this study were in accordance with the Mexican Official Norm on Laboratory Animals’ Care (NOM-062-Z00-1999), National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research [13].

Identification of ejaculatory endophenotypes in rats

To identify the ejaculatory endophenotype in rats, all males were trained during seven copulatory tests performed every 3–4 days in a randomized protocol in which the observer was blind as to the conditions. The experimental unit for these experiments was each rat. Sexual behavior was observed during the dark phase, under dim red-light illumination. The males were placed in a circular Plexiglas

mating arena (50 cm diameter and 50 cm height) with wood shavings covering the floor for 5 min to habituate. Immediately afterward, a sexually receptive female was introduced into the mating arena.

The copulatory observation was terminated at 15 min if the male did not show copulatory patterns or only mounting behavior, or at 30 min after the first intromission if no ejaculation, or at the time of ejaculation. Conventional copulatory parameters registered were as follows: mount, intromission, and ejaculation latencies (ML, IL, EL; expressed in seconds); the number of mounts and intromissions (NM, NI); and the post-ejaculatory interval (PEI, expressed in seconds.) The inter-intromission interval was calculated as follows: EL/NI, also expressed in seconds.

Only those males that ejaculated maintaining a consistent ejaculation latency were selected according to their ejaculatory phenotype (49 of 75 subjects). The values of the ejaculation latency, that we obtained and expressed as [median (first quartile–third quartile)] was similar to previous reported values expressed as means \pm standard error. Thus, ejaculation latency was [236 (217.2–300.4) s] for rapid, [663.2 (583.6–906.9) s] for intermediate, and [1582.2 (1351.2–2116.79) s] for sluggish ejaculators. The average ejaculation latency was 247 ± 45 s for rapid, 717 ± 133 s for intermediate, and 1697 ± 80 s for the sluggish ejaculators, in accordance with the values previously described in other reports [8, 9].

Nociception testing

The VTTS was determined in freely-moving rats as described elsewhere, divided into the three groups selected according to the copulatory endophenotype [4]. Two stainless steel electrodes were attached to the tail through an adjustable cylindrical plastic cuff that was then taped onto the tail. Conductive gel was applied to the skin of the tail before attaching electrodes. The electrodes were connected and prevented from tangling by the use of a commutator. This procedure did not noticeably hinder the movement of the rats. Electrical shocks (50 ms trains of 60 Hz symmetrical biphasic square waves; pulse duration = 4 ms) were delivered with a constant current shock generator (Nuclear-Chicago, Des Plaines, IL, USA). The current was increased stepwise in 100 μ A units until vocalization was elicited (upper shock level) and then decreased until vocalization ceased (lower shock level). This procedure was repeated three times, shocks being delivered once every 10 s. The three upper shock levels were averaged to provide an estimate of the vocalization threshold. There were no shocks above 2000 μ A. VTTS tests took from 1–3 min to perform, depending on the threshold of the subjects [4, 5].

Experimental procedure

VTTS was evaluated during two ejaculatory series (EJS1, EJS2, after the first intromission of each series), and in their respective PEI1, PEI2. Subjects of each endophenotype: rapid ($n = 21$), intermediate ($n = 20$) or sluggish ($n = 8$), were introduced randomly into the mating arena and pre-copulatory baseline VTTS values were determined. Three min later an estrous female was introduced and VTTS was measured as soon as subjects demonstrated the first intromission, and immediately after ejaculation, i.e., during the PEI. One week later, in order to assess the effect of repeated testing, the same males were evaluated in the VTTS without the female present. The data obtained were expressed as percent change with respect to baseline VTTS. In addition, we recorded the conventional copulatory parameters.

Statistical analysis

The comparison of the VTTS during EJS1 among rapid, intermediate, and sluggish ejaculators was analyzed using the Kruskal Wallis ANOVA followed by the Mann–Whitney U test. The same procedure was used to compare the EJS2, PEI1, and PEI2. The comparison of the VTTS among EJS1, EJS2, PEI1, and PEI2 of each copulatory endophenotype was analyzed using the Friedman test followed by the Bonferroni test.

The comparison of the copulatory parameters during EJS1 among rapid, intermediate and sluggish ejaculators was analyzed using the Kruskal Wallis test followed by the Mann–Whitney U test. The same procedure was used to compare the EJS2, PEI1, and PEI2. Data were analyzed using a confidence level of 95% ($P < 0.05$). Statistical analysis was performed using SPSS software for Windows 10.

Results

The comparison of VTTS among rapid, intermediate, and sluggish ejaculators during EJS1 is shown in Fig. 1a. The same comparisons were performed in EJS2 (Fig. 1a), PEI1, and PEI2 (Fig. 1b). During EJS1 the VTTS of rapid was significantly higher than that of the intermediate and sluggish ejaculators. During EJS2, the VTTS of rapid was significantly higher than that of sluggish ejaculators. Intermediate ejaculators showed significantly higher VTTS than the sluggish ejaculators. The VTTS among endophenotypes during PEI1, PEI2 did not differ significantly. Statistical comparisons of VTTS during EJS1, EJS2, PEI1, and PEI2 are shown in Table 1.

Figure 2 shows the comparison of VTTS among EJS1, EJS2, PEI1, and PEI2 of rapid ejaculators. The same comparison was performed in intermediate and sluggish

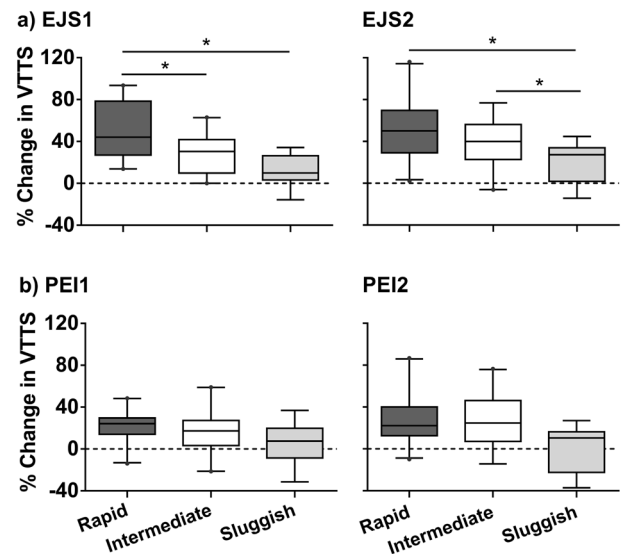


Fig. 1 Vocalization threshold to tail shock (VTTS) among rapid, intermediate, and sluggish ejaculators. **a** In both ejaculatory series (EJS1, EJS2) rapid ejaculators showed higher VTTS than intermediate and sluggish ones. **b** In both postejaculatory intervals (PEI1, PEI2) no differences were observed. Data are expressed as median and first quartile-third quartile. Kruskal Wallis followed by the Mann–Whitney test; * $P < 0.05$.

Table 1 Vocalization threshold to tail shock (VTTS) of rapid, intermediate and sluggish ejaculators.

	VTTS of rapid ($n = 21$)	VTTS of intermediate ($n = 20$)	VTTS of sluggish ($n = 8$)	Kruskal-Wallis
EJS1	44 ^{a,+} (38.2–62.6)	30.4 ^{b,+} (19.6–37.4)	9.9 ^{b,+,&} (–1.7 to –24.7)	H = 13.7 $P = 0.001$
PEI1	24.1 ^{&} (14.4–29.5)	17.2 ^{&} (6.3–26.9)	7.5 ⁺ (–11.8 to –23.0)	H = 4.5 $P = 0.101$
EJS2	50 ^{a,+} (38.9–64.4)	39.9 ^{a,+} (25.9–49)	27.2 ^{b,&} (3.8–37.2)	H = 7.9 $P = 0.019$
PEI2	22.2 ^{&} (17.3–39.4)	24.8 ^{&,+} (14.8–39)	10.4 ⁺ (–17.9 to –20.1)	H = 5.9 $P = 0.052$
Friedman	F = 31.5 $P = 0.001$	F = 20.2 $P = 0.001$	F = 10.8 $P = 0.013$	

Data are expressed as median (first quartile-third quartile). Different super index letters indicate that the group values differ significantly among copulatory endophenotypes (see rows; Kruskal-Wallis), $P < 0.05$. Different super index symbols indicate that the group values differ significantly among the endophenotypes (see columns; Friedman), $P < 0.05$.

EJS1 First ejaculatory series. *EJS2* Second ejaculatory series, *PEI1* First postejaculatory interval, *PEI2* Second postejaculatory interval.

ejaculators. In rapid ejaculators, VTTS was significantly higher in EJS1 than PEI1 and PEI2. VTTS was significantly higher in EJS2 than PEI1 and PEI2. In intermediate ejaculators, VTTS during EJS1 was significantly higher than in PEI1, and VTTS EJS2 was significantly higher than in

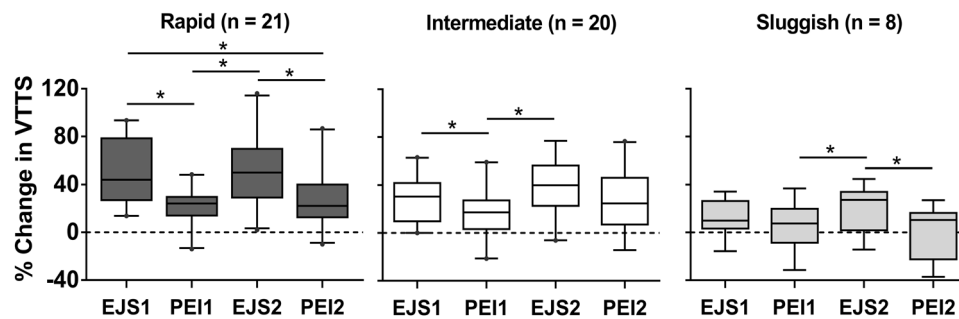
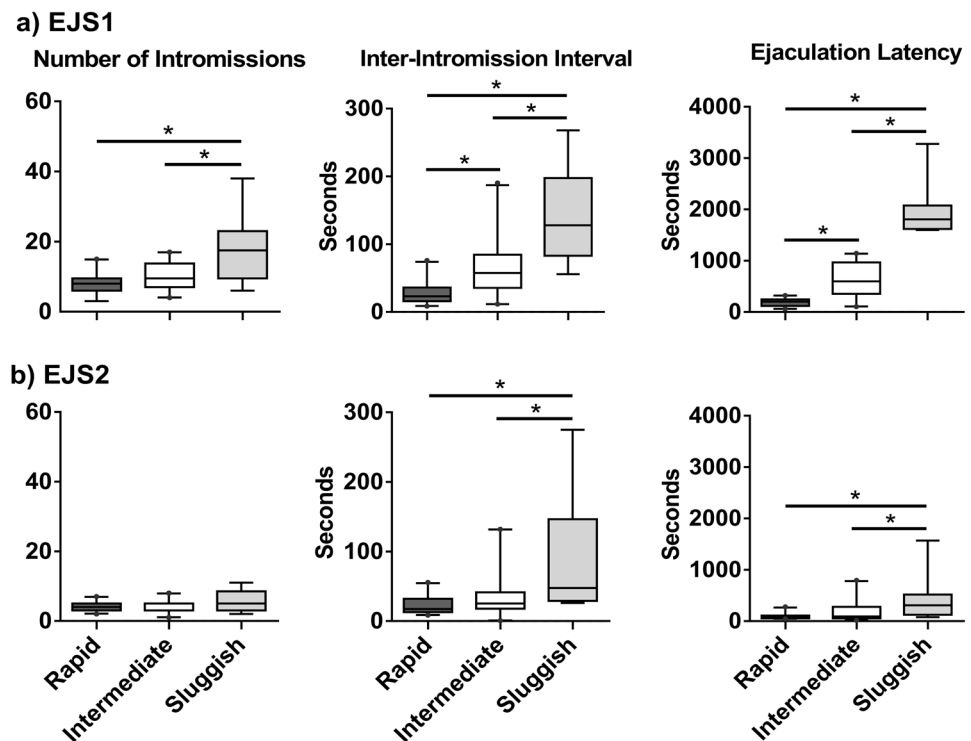


Fig. 2 Vocalization threshold to tail shock (VTTS) in each endophenotype throughout two ejaculatory series (EJS1, EJS2) and two postejaculatory intervals (PEI1, PEI2). Rapid ejaculators showed higher VTTS in EJS1 and EJS2 compared to both PEI.

Intermediate ejaculators showed higher VTTS during both EJS than the PEI1. Sluggish ejaculators showed higher VTTS during the EJS2 compared to both PEI. Data are expressed as median and first quartile-third quartile. Friedman test followed by Bonferroni test; $*P < 0.05$.

Fig. 3 Copulatory parameters of rapid, intermediate, and sluggish ejaculators in two ejaculatory series. Note that the number of intromissions, the inter-intromission interval and the ejaculation latency show more significant differences among copulatory endophenotypes in the first (a) than in the second ejaculatory series (b). Data are expressed as median and first quartile-third quartile. Kruskal Wallis followed by the Mann-Whitney test; $*P < 0.05$.



PEI1. In the sluggish ejaculators, VTTS during EJS2 was significantly higher than PEI1 and PEI2.

The copulatory parameters are shown in Fig. 3. During EJS1, the rapid ejaculators showed a significantly lower NI than the sluggish ejaculators. The NI of intermediate ejaculators was lower than the sluggish ejaculators (Fig. 3a). The III was significantly shorter in rapid ejaculators than sluggish ejaculators. Also, the III of rapid ejaculators was significantly shorter than of the intermediate ejaculators. The III of intermediate ejaculators was significantly shorter than that of the sluggish ejaculators (Fig. 3a). The EL was shorter in the rapid than the sluggish ejaculators. The EL of the rapid ejaculators was significantly shorter than that of

the intermediate ejaculators. In addition, the EL of the intermediate ejaculators was significantly shorter than of the sluggish ejaculators (Fig. 3a).

In Fig. 3b, the EJS2 did not show a significant difference in NI among the rapid, intermediate and sluggish ejaculators. However, the III was shorter in the rapid than the sluggish ejaculators. The intermediate ejaculators also showed a significantly shorter III than the sluggish ejaculators. The EL was significantly shorter in the rapid ejaculators than the sluggish ejaculators. The EL of the intermediate ejaculators was significantly shorter than of the sluggish ejaculators. Statistical comparisons of copulatory parameters are summarized in Table 2.

Table 2 Copulatory parameters of rapid, intermediate and sluggish ejaculators.

	Rapid (n = 21)	Intermediate (n = 20)	Sluggish (n = 8)	Kruskal–Wallis
EJS1				
Number of intromissions	8.0 ^a (6.6–9.3)	9.5 ^a (8.3–11.9)	17.5 ^b (9.4–26.4)	H = 10.3 P = 0.006
Inter-intromission interval (s)	23.2 ^a (19.7–35.2)	57.9 ^b (45.5–85.8)	127.9 ^c (80.1–199.9)	H = 24.4 P = 0.001
Ejaculation latency (s)	201 ^a (155.4–228.4)	599 ^b (484.4–790.3)	1804.5 ^c (1513.9–2441.8)	H = 32.9 P = 0.001
EJS2				
Number of intromissions	4 (3.6–4.8)	3 (2.9–4.6)	5 (2.9–8.3)	H = 2.6 P = .279
Inter-intromission interval (s)	17.3 ^a (17.2–28.7)	25.4 ^a (21.7–55.5)	47.7 ^b (11.9–162.3)	H = 10.8 P = 0.004
Ejaculation latency (s)	73 ^a (66.6–114.3)	91 ^a (93.8–282.8)	308 ^b (36.8–843.9)	H = 10.5 P = 0.005

Data are expressed as median (first quartile–third quartile). The last three copulatory tests were averaged. Different super index letters indicate significant group differences, $P < 0.05$.

EJS1 first ejaculatory series. *EJS2* second ejaculatory series.

Discussion

The present results provide evidence that male rats belonging to the different ejaculatory endophenotypes showed different VTTS values; the rapid ejaculators presented the highest values. Although the sluggish males shortened their ejaculation latency in EJS2, it was still longer than that of the other endophenotypes in EJS2. The VTTS of sluggish ejaculators was lower than that of the rapid and intermediate ejaculators. Since the increase in VTTS is interpreted as indicative of analgesia, then the rapid ejaculators manifested the highest level of analgesia, presumably due to the most intromissions per unit time.

A possible ontogenic basis for the differences in ejaculation latency

Some studies have shown anatomical differences related to peripheral innervation in men with premature ejaculation, i.e., an increased number of branches of the dorsal penile nerve [14, 15], related to higher tactile sensitivity [16, 17]. The surgical transection of some of those nerve branches in men produced an increase in the ejaculatory latency [15]. Those findings suggest that a greater number of sensory fibers enable a shorter ejaculation latency, perhaps in rats as well as humans. Development of myelination of sensory fibers of the sural nerve was facilitated by maternal licking in early postnatal life [18]. Thus, it is possible that the genital licking could stimulate myelination of the dorsal penile nerve, i.e., the sensory branch of the pudendal nerve. Deficient maternal licking may lead to sub-optimal myelination and hence low penile sensitivity in sluggish

ejaculators. A greater level of maternal licking could result in higher penile sensitivity, which could shorten the ejaculation latency in rapid ejaculators. Male rats that receive a relatively low level of genital licking may also develop lower dendritic density in the motoneurons that innervate the bulbospongiosus muscle involved in the ejaculatory motor pattern [19]. Other evidence indicated that genital licking of the pups by the dam during the early postnatal period was associated with penile erections in ex copula conditions; less genital licking resulted in fewer penile erections [20]. Thus, it is possible that during their early postnatal period, the rapid ejaculators in the present study received more genital licking than the other copulatory endophenotypes males.

Possible neurotransmitter basis for differences in male copulation-induced analgesia

The degree of copulatory analgesia was correlated with sexual stimulation on the basis that successive intromissions led to increased pain thresholds. Genital stimulation during mounts and intromission increased sexual stimulation, and also decreased pain perception [4]. Ejaculation resulted in GABA release [21, 22] briefly inhibiting copulation after ejaculation [23], also inducing analgesia [24]. Other neurotransmitters (e.g., serotonin and opioids) are involved in male copulatory behavior [5, 9, 25, 26], and in analgesic processes [2, 5, 27, 28]. For example, serotonin may facilitate the display of copulatory behavior, as the administration of 5-HT-1A receptor agonists (8-OH-DPAT, buspirone and flexinosane) shorten the ejaculation latency [29]. In addition, methysergide, a serotonin antagonist, reduced

copulatory-induced analgesia [5]. Thus intromissions may increase serotonin release in male rats, contributing to copulatory analgesia.

During copulation, opioids are released in relation to ejaculation, suggesting their participation in copulatory-induced reward [30]. Morphine administration (non-selective opioid agonist) reduced the ejaculation latency [25]. This suggests that the reward-inducing effect of opioids occurs simultaneously with copulatory-induced analgesia [2, 3, 5]. Rapid ejaculators may have more opioid receptors and/or greater release of opioids than sluggish ejaculators, thereby contributing to their shortest ejaculation latency and highest degree of analgesia [5, 25].

Copulation is a rewarding behavior modulated by the mesolimbic dopaminergic system. Endocannabinoids released by copulation activate the mesolimbic system, the activation of which releases dopamine [31]. Endocannabinoids such as anandamide facilitate sexual behavior in normal active males, but also in sluggish males by reducing the ejaculation latency [32]. Endocannabinoids act on CB1 receptors that are present in the spinal cord among other structures of the central nervous system. The activation of CB1 receptors facilitates male sexual behavior, and also participates in analgesia [33].

Sensory activity generated from the genital region during copulation produces copulatory analgesia [5]. Serotonin is released into the spinal cord by descending fibers from raphe neurons [34]. The raphe nucleus produces analgesia in response to electrical stimulation [35], and its firing rate increases during sexual arousal associated with the initiation of copulation [36]. In addition, opiateergic [37] and GABAergic [38] spinal neurons are activated when nerves of the pelvic structures are stimulated. Ejaculation-produced GABA release [21] could inhibit both sexual behavior (i.e., resulting in the refractory period), and the pain response. The balance between these two effects could differ among the ejaculator endophenotypes. The medial preoptic region plays a critical role in the control of male sexual behavior [7]; it projects to the periaqueductal gray in the midbrain, which projects to the paragigantocellular nucleus in the pons, from which fibers descend to the spinal nuclei that control ejaculation [39]. As the periaqueductal gray also modulates sensitivity to pain and is neurochemically heterogeneous [40], this heterogeneity could contribute to the ejaculatory endophenotypes variability.

During copulation, the genital stimulation is transmitted by the sensory dorsal penile nerve to the sacral spinal cord [41]. Sensory spinal cord information reaches the oxytocinergic neurons of the paraventricular nucleus of the hypothalamus [42]. Those neurons project directly via descending fibers to the lumbosacral spinal cord [42] releasing oxytocin that facilitates penile erection [43–45]. On the other hand, oxytocin also induces analgesia [46, 47]. Oxytocin mediates

analgesia produced by copulation in male rats [48]. It is probable that there is significant oxytocin release in the spinal cord of the rapid ejaculators.

Intromissions, rather than ejaculation, induce analgesia mediated by central oxytocin [48]. In the present study evaluating VTTS during copulation, we found that pain threshold was increased during intense copulatory behavior, i.e., in the EJS1 of rapid males and in the EJS2 of rapid and intermediate males. It is possible that sexual stimulation is increased quickly in rapid ejaculators due to the shortest inter-intromission interval in EJS1, possibly due to more sensory genital nerve branches, and more activated oxytocinergic neurons of the paraventricular nucleus, and consequently more release of oxytocin. During the EJS2, rapid and intermediate males presented similar VTTS. In this case, perhaps the accumulated sexual stimulation of the EJS1 facilitated the oxytocin release of more neurons, thus producing the comparable levels of analgesia among them.

Female rats also show copulation-induced analgesia

The first analgesia studies were performed in female rats [49], in response to artificial vagino-cervical stimulation. This stimulus also produced oxytocin release in the spinal cord [50, 51]. Consistent with this finding, analgesia by natural vagino-cervical stimulation during mating was reduced by atosiban, an oxytocin receptor antagonist, indicating that

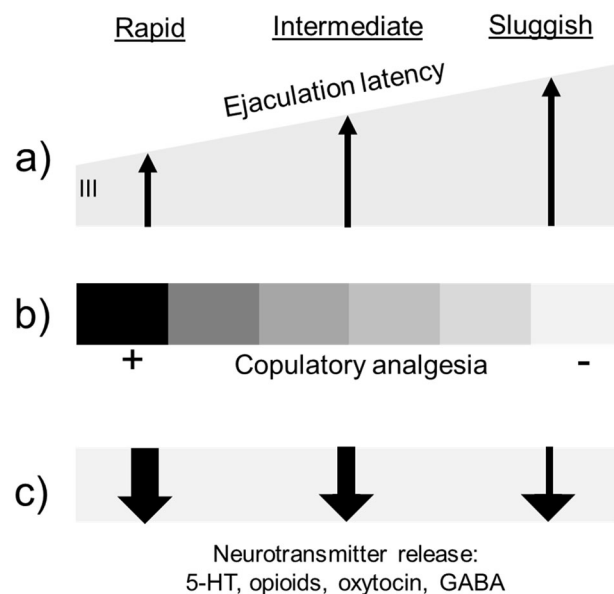


Fig. 4 Hypothetical schema to account for copulatory analgesia. **a** Rapid ejaculators showed the shortest III, and the sluggish males the longest III, indicating more sexual activity by the former. **b** Rapid ejaculators presented the highest copulatory analgesia compared to the sluggish males. **c** Rapid ejaculators had the highest analgesia and the shortest ejaculation latency, possibly related to their relatively highest level of release of 5-HT, opioids, oxytocin, GABA, and/or density of the corresponding receptors. III inter-intromission interval.

copulation-induced analgesia is regulated by endogenous oxytocin also in female rats [52].

Conclusion

Sensory impulses that arise from the internal and external genital structures during copulation generate analgesia. The level of analgesia depends on the speed of copulation in male rats; i.e., the shorter the inter-intromission interval, the higher the level of analgesia (Fig. 4). This could be due in part to neurotransmitter release of 5-HT, opioids, oxytocin, and GABA in the spinal cord [5, 33, 34, 46], and/or due to a higher density of the corresponding receptors. Future pharmacological analyses are required to understand the neurochemical processes related to copulatory analgesia occurring in male rats with different ejaculatory endophenotypes. Evolutionarily, copulatory analgesia of rapid males could provide an adaptive advantage by reducing aversive penile sensation, thereby enabling a higher number of ejaculatory series per unit time.

Acknowledgements We thank the “Posgrado en Ciencias Biológicas” of the Universidad Autónoma de Tlaxcala for the training received during the Doctorate studies.

Funding This research was partially supported by PROMEP/103.5/09/1294, and CONACYT [grant 1134291 (OGF), and fellowships 487025/277841 (CEAP) and 400424 (MRFM)].

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Publisher’s note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

1. Yaksh T. The effects of intrathecal administered opioid and adrenergic agents of spinal function. In: Yaksh T, editor. *Spinal afferent processing*. New York: Plenum Press; 1986. p. 505–39. <https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4994-5>.
2. Szechtman H, Hershkowitz M, Simantov R. Sexual behavior decreases pain sensitivity and stimulates endogenous opioids in male rats. *Eur J Pharmacol*. 1981;70:279–85. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(81\)90161-8](https://doi.org/10.1016/0014-2999(81)90161-8).
3. Forsberg G, Wiesenfeld-Hallin Z, Eneroth P, Södersten P. Sexual behavior induces naloxone-reversible hypoalgesia in male rats. *Neurosci Lett*. 1987;81:151–4. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(87\)90356-9](https://doi.org/10.1016/0304-3940(87)90356-9).
4. González-Mariscal G, Gómora P, Caba M, Beyer C. Copulatory analgesia in male rats ensues from arousal, motor activity, and genital stimulation: blockage by manipulation and restraint. *Physiol Behav*. 1992;51:775–81. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(92\)90115-I](https://doi.org/10.1016/0031-9384(92)90115-I).
5. González-Mariscal G, Gómora P, Beyer C. Participation of opiate, GABAergic, and serotonergic systems in the expression of copulatory analgesia in male rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1994;49:303–7. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(94\)90425-1](https://doi.org/10.1016/0091-3057(94)90425-1).
6. Saldívar-González A, Fernández-Guasti A. Ejaculation induced changes in escape latency in the hot plate test: pharmacological analysis of anxiolytic versus analgesic effect. *Behav Brain Res*. 1994;60:191–8. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(94\)90147-3](https://doi.org/10.1016/0166-4328(94)90147-3).
7. Sachs BD, Barfield RJ. Functional analysis of masculine copulatory behavior in the rat. In: Rosenblatt JS, Hinde RA, Shaw E, Beer C, editors. *Advances in the Study of Behavior*, vol 7. Academic Press; 1976. p. 91–154. [https://doi.org/10.1016/S0065-3454\(08\)60166-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3454(08)60166-7).
8. Pattij T, Olivier B, Waldinger M. Animal models of ejaculatory behavior. *Curr Pharm Des*. 2005;145:10–20. <https://doi.org/10.2174/138161205774913363>.
9. Olivier B, Chan JSW, Pattij T, de Jong TR, Oosting RS, Veening JG, et al. Psychopharmacology of male rat sexual behavior: modeling human sexual dysfunctions?, *Int J Impot Res*. 2006; S14–S23. <https://doi.org/10.1038/sj.ijir.3901330>.
10. Borgdorff AJ, Rössler AS, Clément P, Bernabé J, Alexandre L, Giuliano F. Differences in the spinal command of ejaculation in rapid ejaculating rats. *J Sex Med*. 2009;6:2197–205. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2009.01308.x>.
11. Zipse LR, Brandling-Bennett EM, Clark AS. Paced mating behavior in the naturally cycling and the hormone-treated female rat. *Physiol Behav*. 2000;70:205–9. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(00\)00242-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(00)00242-0).
12. Lucio RA, Rodríguez-Piedracruz V, Tlachi-López JL, García-Lorenzana M, Fernández-Guasti A. Copulation without seminal expulsion: the consequence of sexual satiation and the Coolidge effect. *Andrology*. 2014;2:450–7. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2014.00209.x>.
13. Kilkeny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*. 2010;8:e1000412. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412>.
14. Zhang HF, Zhang CY, Li XH, Fu ZZ, Chen ZY. Dorsal penile nerves and primary premature ejaculation. *Chin Med J*. 2009;122:3017–9. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2009.24.020>.
15. Zhang GX, Yu LP, Bai WJ, Wang XF. Selective resection of dorsal nerves of penis for premature ejaculation. *Int J Androl*. 2012;35:873–9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2012.01296.x>.
16. Guo L, Liu Y, Wang X, Yuan M, Yu Y, Zhang X, et al. Significance of penile hypersensitivity in premature ejaculation. *Sci Rep*. 2017;7:10441–6. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09155-8>.
17. Paick JS, Jeong H, Park MS. Penile sensitivity in men with premature ejaculation. *Int J Impot Res*. 1998;10:247–50. <https://doi.org/10.1038/sj.ijir.3900368>.
18. Segura B, Melo AI, Fleming AS, Mendoza-Garrido ME, González del Pliego M, Aguirre-Benitez EL, et al. Early social isolation provokes electrophysiological and structural changes in cutaneous sensory nerves of adult male rats. *Dev Neurobiol*. 2014;74:1184–93. <https://doi.org/10.1002/dneu.22197>.
19. Lenz KM, Sengelaub DR. Maternal licking influences dendritic development of motoneurons in a sexually dimorphic neuromuscular system. *Brain Res*. 2006;1092:87–99. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.03.070>.
20. Lenz KM, Graham MD, Parada M, Fleming AS, Sengelaub DR, Monks DA. Tactile stimulation during artificial rearing influences adult function and morphology in a sexually dimorphic neuromuscular system. *Dev Neurobiol*. 2008;68:542–57. <https://doi.org/10.1002/dneu.20608>.

21. Qureshi GA, Södersten P. Sexual activity alters the concentration of amino acids in the cerebrospinal fluid of male rats. *Neurosci Lett*. 1986;70:374–8. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(86\)90582-3](https://doi.org/10.1016/0304-3940(86)90582-3).
22. Hull EM, Bitran D, Pehek EA, Warner RK, Band LC, Holmes GM. Dopaminergic control of male sex behavior in rats: effects of an intracerebrally-infused agonist. *Brain Res*. 1986;370:73–81. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)91106-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)91106-6).
23. Fernández-Guasti A, Larsson K, Beyer C. GABAergic control of masculine sexual behavior. *Pharmacol Biochem Behav*. 1986;24:1065–70. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(86\)90456-9](https://doi.org/10.1016/0091-3057(86)90456-9).
24. Sawynok J. GABAergic mechanisms of analgesia: an update. *Pharmacol Biochem Behav*. 1987;26:463–74. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(87\)90148-1](https://doi.org/10.1016/0091-3057(87)90148-1).
25. Agmo A, Paredes R. Opioids and sexual behavior in the male rat. *Pharmacol Biochem Behav*. 1988;30:1021–34. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(88\)90135-9](https://doi.org/10.1016/0091-3057(88)90135-9).
26. Veening JG, Coolen LM. Neural mechanisms of sexual behavior in the male rat: emphasis on ejaculation-related circuits. *Pharmacol Biochem Behav*. 2014;121:170–83. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.12.017>.
27. Basbaum AI, Fields HL. Endogenous pain control mechanisms: review and hypothesis. *Ann Neurol*. 1978;4:451–62. <https://doi.org/10.1002/ana.410040511>.
28. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 2009;139:267–84. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>.
29. Waldinger MD. The neurobiological approach to premature ejaculation. *J Urol*. 2002;168:2359–67. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)64146-8](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)64146-8).
30. Agmo A, Berenfeld R. Reinforcing properties of ejaculation in the male rat: role of opioids and dopamine. *Behav Neurosci*. 1990;104:177–82. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.104.1.177>.
31. Lupica CR, Riegel AC. Endocannabinoid release from midbrain dopamine neurons: a potential substrate for cannabinoid receptor antagonist treatment of addiction. *Neuropharmacology*. 2005;48:1105–16. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.03.016>.
32. Rodríguez-Manzo G, Canseco-Alba A. Anandamide reduces the ejaculatory threshold of sexually sluggish male rats: possible relevance for human lifelong delayed ejaculation disorder. *J Sex Med*. 2015;12:1128–35. <https://doi.org/10.1111/jsm.12866>.
33. Rice ASC, Farquhar-Smith WP, Nagy I. Endocannabinoids and pain: spinal and peripheral analgesia in inflammation and neuropathy. *Prostag Leukotr Ess Fat Acids*. 2002;66:243–56. <https://doi.org/10.1054/plef.2001.0362>.
34. Sorkins LS, McAdoo DJ, Willis WD. Raphe magnus stimulation-induced antinociception in the cat is associated with release of amino acids as well as serotonin in the lumbar dorsal horn. *Brain Res*. 1993;618:95–108. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90433-n](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90433-n).
35. Hammond DL, Levy RA, Proudfit HK. Hypoalgesia induced by microinjection of a norepinephrine antagonist in the nucleus raphe magnus: reversal by intrathecal administration of a serotonin antagonist. *Brain Res*. 1980;201:475–9. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(80\)91056-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(80)91056-2).
36. Jacobs BL. Central monoaminergic neurons: single-unit studies in behaving animals. In: Meltzer HY, editor. *Psychopharmacology*. 3rd ed. New York: Raven Press; 1987. p. 159–69. <https://doi.org/10.1002/mds.870040114>.
37. Gintzler AR, Peters LC, Komisaruk BR. Attenuation of pregnancy-induced analgesia by hypogastric neurectomy in rats. *Brain Res*. 1983;277:186–8. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(83\)90924-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(83)90924-1).
38. Roberts LA, Beyer C, Komisaruk BR. Nociceptive responses to altered GABAergic activity at the spinal cord. *Life Sci*. 1986;39:1667–74. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(86\)90164-5](https://doi.org/10.1016/0024-3205(86)90164-5).
39. Mantyh PW, Peschanski M. Spinal projections from the periaqueductal grey and dorsal raphe in the rat, cat and monkey. *Neuroscience*. 1982;7:2769–76. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(82\)90099-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(82)90099-9).
40. Moss MS, Basbaum AI. The peptidergic organization of the cat periaqueductal grey. II. The distribution of immunoreactive substance P and vasoactive intestinal polypeptide. *J Neurosci*. 1983;3:1437–49. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.03-07-01437.1983>.
41. McKenna KE, Nadelhaft I. The organization of the pudendal nerve in the male and female rat. *J Comp Neurol*. 1985;248:532–49. <https://doi.org/10.1002/cne.902480406>.
42. Swanson LW, Kuypers HGJM. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *J Comp Neurol*. 1980;194:555–70. <https://doi.org/10.1002/cne.901940306>.
43. Argiolas A, Melis MR. The role of oxytocin and the paraventricular nucleus in the sexual behaviour of male mammals. *Physiol Behav*. 2004;83:309–17. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.08.019>.
44. Véronneau-Longueville F, Rampin O, Freund-Mercier MJ, Tang Y, Calas A, Marson L, et al. Oxytocinergic innervation of autonomic nuclei controlling penile erection in the rat. *Neuroscience*. 1999;95:247–54. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(99\)00262-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(99)00262-6).
45. Baskerville TA, Allard J, Wayman C, Douglas AJ. Dopamine-oxytocin interactions in penile erection. *Eur J Neurosci*. 2009;30:2151–64. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06999.x>.
46. Rojas-Piloni G, López-Hidalgo M, Martínez-Lorenzana G, Rodríguez-Jiménez J, Condés-Lara M. GABA-mediated oxytocinergic inhibition in dorsal horn neurons by hypothalamic paraventricular nucleus stimulation. *Brain Res*. 2007;1137:69–77. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.12.045>.
47. González-Hernández A, Rojas-Piloni G, Condés-Lara M. Oxytocin and analgesia: future trends. *Trends Pharmacol Sci*. 2014;35:549–51. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2014.09.004>.
48. Futagami H, Sakuma Y, Kondo Y. Oxytocin mediates copulation-induced hypoalgesia of male rats. *Neurosci Lett*. 2016;618:122–6. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.03.007>.
49. Komisaruk BR, Larsson K. Suppression of a spinal and a cranial nerve reflex by vaginal or rectal probing in rats. *Brain Res*. 1971;35:231–5. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(71\)90608-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(71)90608-1).
50. Sansone GR, Gerdes CA, Steinman JL, Winslow JT, Ottenweller JE, Komisaruk BR, et al. Vaginal stimulation releases oxytocin within the spinal cord in rats. *Neuroendocrinology*. 2002;75:306–15. <https://doi.org/10.1159/000057340>.
51. Komisaruk BR, Sansone G. Neural pathways mediating vaginal function: the vagus nerves and spinal cord oxytocin. *Scand J Psychol*. 2003;44:241–50. <https://doi.org/10.1111/1467-9450.00341>.
52. Gómora P, González-Flores O, Galicia-Aguas YL, Hoffman KL, Komisaruk BR. Copulation-induced antinociception in female rats is blocked by atosiban, an oxytocin receptor antagonist. *Horm Behav*. 2019;107:76–79. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.12.001>.



Department of Psychology
College of Arts and Sciences
Rochester, MI 48309-4489
(248)-370-2285

April 6, 2021

To whom it may concern:

This is to confirm that the following chapter has formally been accepted for publication:

Lucio, R.A., Fernández-Guasti, A., Fuentes-Morales, M.R. (in press). Ejaculation latency. In T.K. Shackelford (Ed.), *The Cambridge Handbook of Evolutionary Perspectives on Sexual Psychology*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

I anticipate the book will appear in print in late 2021.

Sincerely,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Todd K. Shackelford", written in a cursive style.

Todd K. Shackelford, Ph.D.
Distinguished Professor and Chair
Department of Psychology
Oakland University

Cambridge Handbook of Evolutionary Perspectives on Sexual Psychology

Volume 2

Male sexual adaptations

Part 2

Copulatory adaptations

Chapter 28

Ejaculation latency

Rosa Angélica Lucio¹, Alonso Fernández-Guasti² and Maria Reyna Fuentes-Morales^{1,3}

1 Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Carretera Tlaxcala-Puebla km 1.5 s/n, Loma Xicohténcatl, CP 90062, Tlaxcala, Tlax.
México.

2 Departamento de Farmacobiología. CINVESTAV-Sede Sur, México, D.F., México.

3 Doctorado en ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad
Universitaria, CP 04510, México, D.F., México.

Keywords

Ejaculatory phenotypes, ejaculate, ejaculatory threshold, male sexual function, non-copulating males.

Abstract

The ejaculation latency is defined as the time from penile intromission to ejaculation. The chapter does not pretend to exhaustively cover all aspects related to this parameter of copulatory behavior, but selectively revises anatomical, intrinsic and environmental factors involved in its regulation, mainly in laboratory rats and men. Except in humans, short ejaculation latencies denote high sexual performance, most likely because of the high biological value of ejaculation: reproduction. Ejaculation, however, not only refers to a characteristic motor copulatory pattern, but also to seminal emission. The first part of the present chapter revises the anatomical substrate of the male sexual function of ejaculation that comprises two different phases: emission and expulsion. The neural control of these two phenomena are described in detail considering its peripheral and central (in the spinal cord and the brain) components. In the second part of the chapter we revise the copulatory diversity considering non-copulating and copulating males. Regarding the former, we expose interesting mechanistic suggestions underlying the former condition: low aromatization of testosterone to estradiol in the medial preoptic area and probably decreased endocannabinoid transmission. In a following section we confirm previous ideas that within a large male population of rats there are males with short, intermediate and long ejaculation latencies. The distribution we found was more alike to that observed in humans: a large amount of subjects with short ejaculation latencies. The characteristic patterns of short, intermediate and long ejaculation latencies may vary according to the training experience or might be surprisingly fixed. Finally we give an example on how the ejaculation latency and the sperm count vary depending on the male's behavioral phenotype, the competition with another male and the female's timing of copulation.

Interestingly, males with short ejaculation latencies were more affected by competition and by the female's regulation of the timing of mating.

Content	Page
1. Introduction	4
1.1 Ejaculation: A male sexual function	4
2. Neuroanatomical substrates of ejaculation	6
2.1 Peripheral nerves and spinal cord segments related to ejaculation	7
2.1.1 Spinal generator for ejaculation	8
2.2 Supraspinal areas related to ejaculation.....	10
3. Copulatory diversity	10
3.1 Non-copulating males	11
3.2 Copulating males	13
4. Rapid, intermediate and sluggish ejaculators	15
4.1 Stables and unstable ejaculatory latencies	17
5. Ejaculatory threshold depends on copulatory conditions	19
5.1 Changes in the ejaculatory threshold and in sperm count: Male competition and female pacing	20
6. Conclusions	22
7. References	23

1. Introduction

Ejaculation is one of the male sexual functions, the other is penile erection. Both sexual functions are required to the execution of male copulatory behavior. Even though copulation is different among mammal males, all of them present insertion of the penis into the vagina before the seminal expulsion. Vaginal penetration i.e., intromission, provokes the necessary male genital stimulation to reach the ejaculatory threshold (Beach and Jordan 1956).

The understanding of the neuroanatomical substrate, the physiological aspects, the behavioral approaches and the pharmacological manipulations require experimentation usually made in animals because in men it has practical and ethical limitations. In fact, much of the research on male sexual function has been carried out in male rats. Usually, behavioral studies have been conducted in laboratory conditions, and just a few in natural or semi-natural circumstances (Larsson 1956, McClintock and Adler 1978, McClintock et al. 1982, Coopersmith and Erskine 1994, Agmo 1997, Tlachi-López et al. 2012).

1.1 Ejaculation: A male sexual function

The male sexual function of ejaculation comprises two different phases: emission and expulsion. The genital structures involved in ejaculation are the epididymal-cauda, the vas deferens, the accessory sexual glands, the urethra, the bladder neck, and the bulbospongiosus muscle.

Seminal emission, the first phase of ejaculation, is under the control of the autonomic nervous system. During emission the neck of the urinary bladder closes to prevent retrograde ejaculation of the seminal fluid, also called semen. The seminal fluid consists of sperm embedded in seminal plasma (Poani 2006). The sperm comes from the

distal epididymis, and the seminal plasma from the secretions of the accessory sexual glands (prostate and seminal vesicles in humans (Mitsuya et al. 1976, Newman et al. 1982), and also from coagulating glands in male rats (Setchell et al. 1994). Sperm and different secretions of the accessory sexual glands converge in the prostatic urethra during the first phase of ejaculation.

The second phase of ejaculation i.e., the seminal expulsion is under the control of the somatic nervous system. The seminal fluid located in the prostatic urethra travels through the membranous urethra, the penile urethra and is propelled through the urethral meatus. Rhythmic pelvic and perineal striated muscles contractions are responsible for the expulsion of seminal fluid. Contractions of the bulbospongiosus perineal muscle play a primary role in seminal expulsion in men (Gerstenberg et al. 1990) and rats (Holmes et al. 1991).

Ejaculation occurs when the **ejaculatory threshold** is reached, and it is defined as the amount of excitation produced by intromission or thrusting to achieve ejaculation. Men and male rats present ejaculation latencies of approximately five-six minutes. Certainly, in both species, there are individual differences (Pattij et al. 2005, Waldinger et al. 2005, Olivier et al. 2006, Aguilar-Pérez et al. on line ahead of print) and the copulatory behavior is different, men present a single intromission with intravaginal pelvic thrusting, usually one ejaculation, and occasionally more than one (Whipple et al. 1998), while rats present multiple intromissions and multiple ejaculations (Dewsbury 1972), with pelvic thrusting (Moralí et al. 1986). **Ejaculation latency** in men is defined as the intravaginal ejaculation latency time (IELT) and it includes the time between the start of vaginal intromission to intravaginal ejaculation (Waldinger et al. 1994). Ejaculation latency in male rats is the time elapsed between the first intromission until ejaculation (Larsson 1956).

2. Neuroanatomical substrates of ejaculation

The genital organs involved in ejaculation are densely innervated by the autonomic nervous system, through sympathetic and parasympathetic fibers, that converge in the pelvic plexus. The pelvic plexus consists of a major pelvic ganglia and other three to five minor ganglia. In humans the pelvic plexus is located retroperitoneally on either side of the rectum, lateral and posterior to the seminal vesicles (Schlegel and Walsh 1987). In male rats the pelvic plexus is attached to the prostatic lateral lobes (Purinton et al. 1973, Dail et al. 1975, de Groat and Steers 1988, Dail et al. 1989, Keast et al. 1989, Bertrand and Keast 2010). The pelvic plexus receives neuronal input from the hypogastric and pelvic nerves in addition to the caudal paravertebral sympathetic chain in men (Keast 1995) and rats (Dail et al. 1989).

The sympathetic neurons of the hypogastric nerves are important for ejaculation, particularly for seminal emission in men and male rats. Thus, the electrical stimulation of the superior hypogastric plexus induces seminal emission in paraplegic men (Brindley et al. 1989). In male rats, the bilateral transection of the hypogastric nerves avoid seminal emission without interfering with the ejaculatory behavior (defined as the behavioral motor pattern characteristic of ejaculation that may be or not accompanied by semen expulsion). The absence of seminal plugs in the vagina of the females that mated with these males confirmed the lack of seminal expulsion (Loranca 1993). Administration of guanethidine monosulfate, that decreases the noradrenergic transmission, prevented seminal emission by impeding seminal expulsion from the urethral meatus (Holmes and Sachs 1991). The absence of semen in the prostatic urethra did not affect the contraction of the bulbospongiosus muscle in copulating male rats (Holmes and Sachs 1991).

The exact trigger for seminal expulsion is unknown. It has been proposed that a spinal center is stimulated during emission of seminal fluid into the prostatic urethra (McKenna et al. 1991). However, men can still have rhythmic contractions during orgasm despite of the ‘dry ejaculation’ characteristic of prostatectomy (Bergman et al. 1979). Likewise, male rats can display behavioral ejaculation, without seminal expulsion, when they are sexually satiated during the Coolidge effect. The lack of seminal fluid was confirmed in the uterine horns of the mated females (Tlachi-López et al. 2012). Although sexually satiated males are unable to expel semen, they preserve penile erection and vaginal insertion capacity that result in the dislodgement of the plug deposited by other males (Lucio et al. 2014, Lucio et al. 2017). Thus, clinical cases in men and experimental approaches in male rats indicate that seminal fluid in the prostatic urethra is not required to trigger the second phase of ejaculation.

2.1 Peripheral nerves and spinal cord segments related to ejaculation

The external (penis and scrotum) and internal genital structures (vas deferens, urethra, accessory sexual glands), the surrounding skin (scrotal, preputial, inguinal, perineal), and the perineal musculature are innervated by four spinal nerves: pudendal, pelvic, hypogastric and genitofemoral (Greene 1959, Schroder 1980, Hulsebosch and Coggeshall 1982, Taylor et al. 1982, see diagrams in: McKenna and Nadelhaft 1986, Nuñez et al. 1986, Manzo et al. 1989, Pascual et al. 1992, see diagrams in: Pacheco et al. 1997, see diagrams in: Zempoalteca et al. 2002, Xu et al. 2006).

In different male mammals, the **afferent sensory innervation** of the prostate, urethra and vas deferens reach the lumbosacral segments, via the pudendal nerve (Pennefather et al. 2000, Kaleczyc et al. 2002). Other pelvic organs innervated by the

afferent fibers of the hypogastric nerve runs through the paravertebral sympathetic chain to enter the spinal cord through the low thoracic (T₁₂) and upper lumbar dorsal roots (L₁-L₂; Baron and Janig 1991). The inguinal skin and the cremaster muscle reach the upper lumbar spinal segments (L₁-L₂), via the genitofemoral nerve (see diagrams in: Zempoalteca et al. 2002).

The **efferent autonomic innervation** of reproductive organs, particularly the sympathetic preganglionic neurons, are located in the intermediolateral column of the thoracolumbar spinal segments (Nadelhaft and McKenna 1987). Their fibers emerge from the spinal cord via the ventral roots and reach the paravertebral sympathetic chain. However, in most male mammals, the sympathetic fibers proceed from the prevertebral ganglia (splanchnic or coeliac superior mesenteric) constituting the hypogastric nerve that terminate in the ipsilateral pelvic plexus. This plexus also receives fibers from the pelvic nerve whose somas are located in the sacral parasympathetic nucleus of the spinal cord. From each pelvic plexus, especially from the major pelvic ganglia, arise fibers innervating reproductive structures involved in ejaculation (Nadelhaft and Booth 1984). The **efferent somatic innervation** of the perineal musculature (bulbospongiosus and ischiocavernosus muscles) receives fibers from the motoneurons of the Onuf's nucleus, or bulbospongiosus nucleus, located in the lumbosacral spinal cord, in men and male rats respectively, via the pudendal nerve (Schroder 1985, see diagrams in: Pacheco et al. 1997).

2.1.1 Spinal generator for ejaculation

Seminal expulsion takes place as a response to copulatory behavior or masturbation due to genital stimulation in men. In addition, male rats (and other species) can expel semen spontaneously due to endogenous activity, apparently without sensory genital stimulation

(Orbach 1961). However, the spontaneous ejaculation is reduced if copulation had occurred, and it is not affected after transecting the thoracic spinal cord (Orbach et al. 1967). Both findings suggested the existence of a pattern generator for ejaculation referred as spinal generator for ejaculation composed by highly interconnected neurons (Truitt and Coolen 2002, Coolen et al. 2004). In many men with spinal cord injury, ejaculation is obtained by applying vibratory stimulation to the penis suggesting, as in male rats, neural commands for ejaculation in the spinal cord (Beckerman et al. 1993).

In male rats, the lumbo-spinothalamic (LSt) neurons are regarded as the fundamental component of the spinal generator for ejaculation (see diagram in: Truitt and Coolen 2002, Borgdorff et al. 2008). The soma of the LSt neurons are located in laminae VII and X of the lumbar segments, specifically at L₃-L₄, and send outputs to the parvocellular subparafascicular neurons of the thalamus that contributes to the integration of genitosensory information (see diagrams in: Ju et al. 1987). Besides, LSt neurons project to spinal preganglionic autonomic (sympathetic and parasympathetic) that innervate the reproductive organs involved in ejaculation. Also, LSt neurons project to spinal somatic nuclei that innervate the bulbospongiosus muscle (Xu et al. 2006). Stimulation of the spinal generator for ejaculation elicits not only the ejaculation response but also seminal expulsion with motile spermatozoa (Borgdorff et al. 2008).

The spinal generator for ejaculation is present since very early postnatal life. In fact, in two-day-old rats application of an ejaculation-like releasing stimulus produces bulbospongiosus electromyographic activity. This activity is similar to that registered in adult male rats. Therefore, it is expected that the spinal generator for ejaculation has an innate rhythmic motor pattern (Carro-Juárez and Rodríguez-Manzo 2005).

2.2 Supraspinal areas related to ejaculation

Groups of discrete regions of neurons in the brain stem and brain constitute the supraspinal areas involved in ejaculation. They are the bed nucleus of stria terminalis (BNST), the subparafascicular nucleus of the thalamus (SPF), the posterodorsal preoptic nucleus (PNpd), and the posterodorsalmedial amygdala (MeApd). Reciprocal connections between them and the medial preoptic area (MPOA) have been evidenced (Coolen et al. 1998, Hebb and Yahr 2001). In addition, the MPOA projects to other neural regions such as the paraventricular thalamic nucleus (PVN), the periaqueductal grey (PAG) in the midbrain, and the paragigantocellular nucleus (nPGi) in the medulla oblonga. Nonetheless, MPOA do not present direct connections with neurons of the spinal generator for ejaculation (Rizvi et al. 1992, Simerly and Swanson 1988, Murphy et al. 1999).

The supraspinal PVN projects to pudendal motor neurons and autonomic preganglionic neurons in the lumbosacral spinal cord (Luiten et al. 1985, McKenna and Nadelhaft 1986). It also projects to nPGi in the brainstem (Bancila et al. 1999). The other supraspinal structure, the SPF send projections to BNST, MeApd, MPOA, and receives input from LSt neurons (Canteras et al. 1995, Coolen et al. 2003). The nPGi nucleus plays an inhibitory role in ejaculation (Marson and McKenna 1990). The PAG acts as a relay between MPOA and nPGi (Marson 2004). These midbrain structures, nPGi and PAG, have a significant role in ejaculation (Giuliano and Clement 2005).

3. Copulatory diversity

Copulation is an innate behavior that begins at puberty. In male rats, the first mounts occurs between 40-50 postnatal days, the first intromissions between 44-75 days, and the first ejaculations between 48-75 days (Hull et al. 2006). At 120 days of age, most males display

the complete copulatory behavior, i.e., mounts and intromissions that culminate in ejaculation, named as ejaculatory series (Larsson 1956). Gonadal hormones shape brain areas and circuits important for copulatory behavior and allow the display of copulatory patterns in response to adequate stimuli (Le Moëne and Agmo 2019). When the first sexual encounter occurs the vast majority of mature sexually naïve male rats display copulatory motor patterns associated with the respective genital responses. The motor pattern of intromission is accompanied by penile erection and intravaginal intromission, and that of ejaculation by seminal expulsion (Hull et al. 2006). However, some male rats fail to mate when exposed to an estrous female (Canseco-Alba and Rodríguez-Manzo 2013, Antonio-Cabrera and Paredes 2014).

3.1 Non-copulating males

Non-copulating males constitute a model to study the factors that modulate motivational sex drive and hence copulatory behavior. Approximately 1-20% of non-copulating rats are present in different strains (Whalen et al. 1961, Lisk 1969, Portillo et al. 2010, Canseco-Alba and Rodríguez-Manzo 2013). Not only male rats are unresponsive to sexual receptive females, also mice (Portillo et al. 2013), guinea-pigs (Harding et al. 1976), gerbils (Clark and Galef 2000), rams (Alexander et al. 1999), and humans (Bogaert 2006, Chasin 2011, van Houdenhove et al. 2014).

Non-copulating male rats are less active in exploration activities, less responsive to novel stimuli and take longer to habituate to novelty (Pottier and Baran 1973). These males show preference for estrous females, although reduced compared to that of copulating males (Portillo and Paredes 2004). It has been shown that the processing of pheromonal signals by the main olfactory system is not altered in non-copulating males (Portillo and

Paredes 2004). Surprisingly, neither penile reflexes nor spontaneous seminal emission are absent in these males, in fact, they are similar to those shown by copulating animals (Stefanick and Davidson 1987). The lack of copulatory behavior is not due to plasma testosterone concentrations (non-copulating males vs copulating males: 2.6 ± 0.2 ng/ml and 2.9 ± 0.4 ng/ml, respectively; Portillo et al. 2006a).

Conversion of testosterone to estradiol, by aromatization, in specific brain areas is required for the expression of male copulatory behavior. The highest activity of cytochrome P540 aromatase occurs in the medial preoptic nuclei (MPN), anterior hypothalamus (AH), ventromedial hypothalamic nuclei (VMN), bed nucleus of the stria terminalis (BNST), as well as in the medial amygdala (MeA; Roselli et al. 1985). The aromatase activity is drastically reduced in the MPOA of non-copulating males, while other brain areas (AH, VMN, BNST, MeA) show a similar aromatase activity (Portillo et al. 2006a).

Castration reduces and also eliminates the display of copulatory behavior but testosterone replacement reestablishes this behavior. The combined treatment of estradiol plus dihydrotestosterone restores copulatory behavior in castrated males to similar levels to those displayed by intact sexually experienced males (Cooke et al. 2003). The presence and the integrity of estrogen- and androgen-receptors are crucial in different brain structures involved in processing chemosensory cues and control the expression of sexual behavior. A lower concentration of estrogen-receptors accompanied by a higher amount of androgen receptors has been evidenced in the MPOA of non-copulating rats (Portillo et al. 2006b). MPOA is crucial for the expression of masculine copulatory behavior in all species (Mesisel and Sachs 1994, Coolen et al. 1998, Paredes 2003) and it modulates both the appetitive (motivational) and consummatory (mount, intromission and ejaculation) aspects of this behavior (Meisel and Sachs 1994).

A series of experiments confirmed that a hormonal alteration in the MPOA underlay the incapacity of some males to copulate. Thus, non-copulating males mated after being implanted in the MPOA with testosterone or estradiol. The effect of either hormone was maintained for a long time, suggesting a permanent change in brain functioning of non-copulating males (Antonio-Cabrera and Paredes 2014). It should be remembered that some manipulations interfere with genital responses, i.e., penile erection and seminal expulsion. Interestingly, these males mated, after being implanted with testosterone or estradiol in the MPOA, with a female in natural oestrus and got litters of more than 10 pups (Antonio-Cabrera and Paredes 2014).

Not only gonadal hormones stimulate mating in non-copulating male rats, also pharmacological treatments with naloxone and the endocannabinoid, anandamide (Canseco-Alba and Rodríguez-Manzo 2013). Unlike gonadal hormones, anandamide induced copulation until ejaculation only in half of the non-copulating males; however, the effect of a single administration was maintained for 14 days (Canseco-Alba and Rodríguez-Manzo 2013), suggesting that the inhibition removal was permanent after the stimulation of the endocannabinoid system. Remarkably, anandamide also reduced the ejaculatory threshold of sexually sluggish male rats, a finding that may have relevance for human delayed ejaculation (Rodríguez-Manzo and Canseco-Alba 2015).

3.2 Copulating males

Copulating male rats represent the majority of the population. When a male is in the presence of a female, he pursues her, and investigates her anogenital region which exposes him to chemosensory cues that may arouse him. Both partners emit ultrasonic vocalizations

which are mutually arousing (Meisel and Sachs 1994). As the male gains experience, he spends less time on pre-copulatory activities, immediately beginning the display of stereotyped copulatory motor patterns (see below). The male executes patterns of mounts intercalated with patterns of intromissions and finally the pattern of ejaculation (described elsewhere, Larsson 1956, Lucio and Tlachi-López 2008). These copulatory motor patterns are recorded and analyzed using the copulatory parameters: a) Mount latency, time in seconds from the introduction of the female until the first mount. b) Intromission latency, the time in seconds from the introduction of the female until the first intromission. c) Number of mounts with pelvic thrusting. d) Number of intromissions with pelvic thrusting and penile insertion into the vagina. e) Ejaculation latency, time in seconds from the first intromission until ejaculation. In addition, the intromission ratio (number of intromissions/number of intromissions+number of mounts), as well as the inter-intromission interval (ejaculation latency/number of intromissions) are calculated (Larsson 1956, Lucio y Tlachi-López 2008). Short latencies to mount and intromit are interpreted as a high motivation to mate. Both from the biological and psychological perspectives, ejaculation is the climax of the male sexual behavior. In the rat and other species, but not in men, short ejaculation latencies reflect an intense copulatory behavior, particularly its consummatory phase, although intermingled with motivational components. Similarly, short inter-intromission intervals also indicate high intensity copulatory behavior (Le Möene and Agmo 2019). Then, the values of the copulatory parameters may all affect the ejaculatory behavior.

4. Rapid, intermediate and sluggish ejaculators

Different ejaculation latencies were observed in Sprague-Dawley male rats (Larsson 1961). In recent years, it was found that within a large population of Wistar strain rats (n=246), exists rapid and sluggish ejaculators. Each group represents approximately 10% of the population at the left and right end of a Gaussian curve (Olivier et al. 2006). The remaining 80% are the rats that correspond to normal (in statistical terms) ejaculators. The rapid males executed 4-5 ejaculations, the sluggish ones displayed 0-1 ejaculations, and the normal ones had 2-3 ejaculations during 30 minutes. The ejaculation latency of rapid rats was the shortest compared to that of the normal and sluggish males (247 ± 45 , 717 ± 133 , and 1697 ± 80 seconds, respectively; Olivier et al. 2006). Another copulatory parameter that differed between groups was the number of mounts (rapid, normal and sluggish males: 8.2 ± 1.8 , 23 ± 4.0 and 42 ± 4.0 , respectively; Olivier et al. 2006). The variations in the copulatory parameters in rats resemble clinical symptoms of premature and retarded ejaculator men (Olivier et al. 2006). Indeed, it was suggested that the differences in mounting behavior are due to variations in penile sensitivity as occurs in men with premature ejaculation. In addition, the sexual motivation was similar in all male rats since there were no differences in the mount latency (Olivier et al. 2006). Therefore, in male rats there are ejaculatory phenotypes: **rapid, normal and sluggish ejaculators**, even more, authors consider them as endophenotypes since they are very stable. Those phenotypes distributed in a Gaussian curve representing the ejaculating frequencies in male rats could be used as a model for human premature and delayed or (an)-ejaculation (Olivier et al. 2006). Furthermore, a hypothetical distribution of intravaginal ejaculation latency time in humans also shows a Gaussian distribution. The left side correspond to men with early

ejaculation, and on the right, those men with retarded or even no-ejaculation (Olivier et al. 2006).

Our group also found ejaculatory phenotypes in rats according to their ejaculation latency. However, the distribution was not Gaussian, instead skewed to the left. The minimum ejaculatory latency was 64 seconds, and the maximum was 1700 seconds. There was a continuum, although most males (53%) presented short ejaculation latencies (101-200 and 201-300 seconds) corresponding to rapid ejaculators (Fig. 1). Olivier et al. (2006) reported 247 ± 45 seconds to rapid males. In our rat population, there were fewer intermediate ejaculators, and even less sluggish ejaculators (Fig. 1).

--- Insert Fig. 1 about here ---

Fig. 1 *Histogram of the distribution of ejaculatory latencies of Wistar male rats (N=102). Data represent the last test of copulatory training regardless of the number of tests displayed by each male (from 6 to 11 tests). Rats ejaculate from 64 to 1700 seconds. A skewed distribution is observed to the left where most animals ejaculate from 100 to 300 seconds, i.e., corresponding to rapid ejaculators.*

In men, the IELT distribution is also not Gaussian as hypothesized by Olivier et al. 2006. Two studies with men of five different countries showed a continuous distribution of IELT that was positively skewed, with a median IELT of 5.4 minutes, ranging from 33 seconds to 44 minutes (Waldinger 2005), and 6 minutes, ranging from 10 seconds to 52 minutes (Waldinger et al. 2009). In addition, epidemiological studies indicate that premature ejaculation is the most common sexual dysfunction, with a prevalence rate between 25 and 40% worldwide across all age groups (Lauman et al. 2005). Such large

range of prevalence rates of PE exists because of the lack of a standard definition, methods of participant's recruitment, data collection, etc.

Thus, it seems that men with premature ejaculation represent a large percentage of population, just as we find in the rat population.

4.1 Stables and unstable ejaculatory latencies

Copulation is an innate behavior, thus it is common that mature sexually rats display copulatory behavior when a male and an estrous female have an encounter. In our population of 102 male rats, we found that most of them showed the ejaculation pattern from the first time they were exposed to a female. There were others that ejaculate in the second, third, fourth or even in the fifth copulatory tests. However, once a male ejaculates, he continues showing this behavior in subsequent tests.

Most copulatory behavioral studies indicate that male rats are sexually experienced without mentioning the criterion used to produce such experience. In our laboratory we selected those males that displayed the ejaculatory pattern in at least four consecutive copulatory tests. Because the duration of the ejaculation latencies is variable among individuals and within the same subject, and not all males ejaculate in the first sessions, sometimes we allow them to copulate more than 8 tests. In spite of this, some males show a large variation in their ejaculation latencies, although they have been submitted to many training tests. Then it is possible to find experienced rats being unstable males, i.e., with a very variable ejaculation latency along the tests (Fig. 2A). Interestingly, by average of the ejaculation latency of these males along the different tests corresponds to those of intermediate ejaculators.

On the other hand, some rats show very stable ejaculation latencies from the first copulatory test (Fig. 2B). Interestingly, it seem that most of these males correspond to rapid ejaculators. In addition, other males ejaculate in the first test with long ejaculation latencies, and around the third test their ejaculation latency duration is reduced and maintained stable in following trials (Fig. 2C). Finally, there are male rats ejaculating from the second, third or fourth copulatory test that maintain the duration of their ejaculation latency in subsequent tests, thus they are also categorized as stable. These males could be rapid or intermediate ejaculators. In our rat population, 45 out of 102 males, i.e., 44% are unstable ejaculators, while 57 out of 102 males, i.e., 56% are stable ejaculators. As aforementioned, the great majority of stable rats are rapid ejaculators.

Then, at least in laboratory conditions, male rats show the rapid and intermediate ejaculatory phenotypes in a stable manner. It is necessary to consider a more large population to identify the sluggish phenotypes. Interestingly, sexual experience has been demonstrated to change the effect of various pharmacological treatments (Ferri et al. 2013) implying permanent dynamic brain changes, most likely associated with memory processes.

--- Insert Fig. 2 about here ---

Fig. 2 *Unstable and stable ejaculators during copulatory training tests of Wistar rats (N=102). The duration of the ejaculation latency is variable in training of 6 tests or more than 6 tests, corresponding to unstable ejaculator male rats (A). In the stable ejaculator males, the ejaculation latency is shown from the first test and is maintained along the training (B) or starts to stay stable from the third test onwards (C).*

5. Ejaculatory threshold depends on copulatory conditions

Ejaculation in rats is preceded by the execution of intromissions (penetrating contacts of less than 0.5 seconds duration) separated from each other by periods of copulatory inactivity (lasting typically 20-60 seconds; Bermant et al. 1969). Successive intromissions build up an excitatory state ending in the ejaculatory response (penetrating contact longer than 1 second, Bermant et al. 1969). Each intromission contributes to increase sexual excitation to trigger ejaculation (Larsson 1959). Ejaculation occurs when the ejaculatory threshold is reached, and it is defined in male rats as the amount of stimulation, i.e., number of intromissions that precede ejaculation, and the time required to achieve ejaculation (Rodríguez-Manzo and Canseco-Alba 2015).

Since midst of the last century it was shown that forcing the intervals between successive intromissions shortens or lengthens the ejaculatory latency (Larsson 1959, Bermant 1969). Forced intervals of 2-3 minutes shorten the ejaculation latency, while those of around 7 minutes prevent ejaculation despite the execution of 30 intromissions. However, not only the interintromission interval is important but the duration of each intromission. Low frequencies are associated with long durations. Thus, intromission duration might indicate the amount of excitation resulted by each intromission (Bermant et al. 1969).

To date the questions about the short and long ejaculation latencies continue. As mentioned above, in pioneering studies, the intromission frequency and the duration of intromission was considered. More recently, the penis sensitivity is also considered in the duration of ejaculation latency. Men with premature ejaculation present more ramifications of the dorsal penile nerve, the sensory branch of the pudendal nerve. An increased number of branches is related with higher tactile sensitivity. In fact, the surgical transection of some

ramifications of the penile dorsal nerve in men result in an increased ejaculatory latency (Zhang et al. 2012).

5.1 Changes in the ejaculatory threshold and in sperm count: Male competition and female pacing

Sperm competition is common in invertebrates and vertebrates. It occurs when the sperm from two or more rivals compete to fertilize the ova of the same female in the same estrous cycle (Parker 1970). Sperm competition is recognized as a major force acting on reproductive anatomy, reproductive physiology and reproductive behavior (Birkhead and Moller 1998). In mammals with sperm competition, males tend to initiate copulation in less time and copulate faster (Gomendio et al. 1998). In this condition, the duration of copulation is shortened. The winner male during mating competition obtain reproductive advantage, the male can mate with more females, having more possibilities to greater offspring (Hogg 1988, Birkhead and Moller 1998).

Few studies in laboratory rats consider a real confrontation between males and evaluate copulatory behavior. In the Long Evans strain, male competition decreased the intromission latency, the number of intromissions and the ejaculation latency (Dewsbury and Hartung 1980). The post-ejaculatory interval also decreased due to the presence of a rival (Estep 1988). Copulation is a dynamic interaction depending on both sexes. In semi-natural conditions it has been evidenced that female rats paced mating (McClintock et al. 1982). Under this condition, the males lengthen the ejaculation latency (Erskine et al. 1985) and the interintromission interval (Gilman et al. 1979, Erskine 1989). In laboratory conditions, female's paced copulation reduced the number of intromissions (Paredes and Vazquez 1999). Studies about male competition and the consequences on the ejaculate have

been done in invertebrates, inspired by the sperm competition theory (Parker 1998). However, just a few are reported in vertebrates, particularly in meadow voles (del Barco-Trillo and Ferkin 2004), bank vole (Lemaitre et al. 2011) and laboratory rats (Pound and Gage 2004). It is worth mentioning that in the latter, there was no confrontation because a plastic screen separated the two males, while one of them was copulating. Every 30 min the seminal plug was checked in the vagina of the mated female and after, the number of expelled sperm was counted. However, in that period more than one ejaculatory series could have occurred, thus, the sperm count probably did not correspond to a single ejaculation. We demonstrated that in a real confrontation between experienced male rats three copulatory parameters are diminished: the ejaculation latency, the number of intromissions and the interintromission interval. Surprisingly, the sperm count was increased (Fuentes-Morales et al. 2020).

Recently, our group considered the ejaculatory phenotypes to analyze copulation in three different conditions: 1) non-competition (one male and one female in the copulatory-arena), 2) competition (two males and one female in the copulatory-arena), and 3) competition+spacing (two males and one female in the copulatory-arena adjacent to a neutral-arena). In this last condition, the bottom of each arena has a hole big enough only for the female to move freely from one arena to the other. In this manner, the female regulates (paces) mating; she searches for the male to mate or escapes him avoiding copulation. Results related to ejaculation latency are shown in Fig. 3A, and those of sperm count are presented in Fig. 3B. We found that the ejaculation latency decreased significantly during competition compared to non-competition, considering all males regardless of their phenotype and also in rapid ejaculators, but not in the males that had intermediate ejaculation latencies (Fig. 3A: left, center and right, respectively).

Interestingly, when mating is under male competition and simultaneously is paced by the female, no differences in the ejaculation latency was found. During competition, the sperm count increased significantly considering all males and rapid ejaculators, but not with the intermediate ones (Fig. 3B: left, center and right, respectively). When mating is under competition and paced by the female no differences in sperm count was found.

--- Insert Fig. 3 about here ---

Fig. 3 *Ejaculation latency (top) and sperm count (bottom) of male rats in different copulatory conditions. (A) Ejaculation latency decrease significantly only during competition compared to non-competition in ejaculator males (without considering ejaculatory phenotype), and rapid ejaculators. (B) Sperm count increase significantly only in competition compared to non-competition in ejaculator males and rapid ejaculators. Competition + pacing did not showed differences compared to non-competition neither in the ejaculation latency nor in sperm count. Data are expressed as median and quartiles. U-Mann-Whitney was used to compare non-competition vs competition, and non-competition vs competition + pacing, using a confidence level of 95% ($p < 0.05$).*

These results confirm that the ejaculation latency may change due to the copulation context. However, such changes seem to depend on the male phenotype, the competition and the female's pacing of copulation.

6. Conclusions

The ejaculation latency can be seen as a complex behavioral parameter that is influenced by the following factors: the phenotype of the male, i.e., if the subject has a constitutive short, intermediate or long latency to reach ejaculation. The biological bases of such characteristic

could be in the neural control of ejaculation that encompasses the sensory pathways transmitting information from the genitals to the spinal cord, the integration of this information at least at two different sites: in the spinal cord and in the brain and in the motor effector system that includes a series of successful and coordinated events that permit the coupling of the behavioral features with seminal emission and expulsion. In addition, in the ejaculation latency there are intermingled consummatory (executory) and motivational aspects of copulation that may be modified by external factors as experience, the timing between intromissions, the competition with other males and the paced regulation of mating imposed by the female. For sure, there are other external modulators of this parameter that await further studies.

References

1. Agmo A (1997) Male rat sexual behavior. *Brain Research Protocols* 1: 203-209.
2. Aguilar-Pérez, Gómora-Arrati P, Komisaruk BR, Fuentes-Morales MR, Morales-Medina JC, González-Flores O, Lucio RA (on line ahead of print). Threshold for copulation-induced analgesia varies according to the ejaculatory endophenotypes in rats. *Int J Imp Res*.
3. Alexander BM, Stellflug JN, Rose JD, Fitzgerald JA, Moss GE (1999) Behavior and endocrine changes in high-performing, low-performing, and male oriented domestic rams following exposure to rams and ewes in estrus when copulation is precluded. *J Anim Sci* 77: 1869-1887.
4. Antonio-Cabrera E, Paredes RG (2014) Testosterone or estradiol implants in the medial preoptic area induce mating in non-copulating male rats. *J Neuroendocrinol* 26: 448-458.

5. Bancila M, Verge D, Rampin O, Backstrom JR, Sanders-Bush E, McKenna KE, Marson L, Calas A, Giuliano F (1999) 5-Hydroxytryptamine_{2C} receptors on spinal neurons controlling penile erection in the rat. *Neuroscience*. 92: 1523-1537.
6. Baron R, Janig W (1991) Afferent and sympathetic neurons projecting into lumbar visceral nerves of the male rat. *J Comp Neurol* 314: 429-436.
7. Beach FA, Jordan L (1956) Sexual exhaustion and recovery in the male rat. *Q J Exp Psychol* 8: 121-133.
8. Beckerman H, Becher J, Lankhost GJ (1993) The effectiveness of vibratory stimulation in anejaculatory men with spinal cord injury. Review article. *Paraplegia* 31: 689-699.
9. Bergman B, Nilsson S, Petersen I (1979) The effect on erection and orgasm of cystectomy, prostatectomy and vesiculectomy for cancer of the bladder: A clinical and electromyographic study. *Br J Urol* 51: 114-120.
10. Bermant G, Anderson L, Parkinson SR (1969) Copulation in rats: Relations among intromission duration, frequency, and pacing. *Psychon Sci* 17: 293-294.
11. Bertrand MM, Keast JR (2010) Dissection of pelvic autonomic ganglia and associated nerves in male and female rats. *J Vis Exp* 157: 1-8.
12. Birkhead TR, Moller AP (Eds). *Sperm Competition and Sexual Selection*. Academic Press. San Diego, CA. (1998).
13. Bogaert A (2006) Toward a conceptual understanding of asexuality. *Rev Gen Psychol* 10: 241-250.
14. Borgdorff AJ, Bernabé J, Denys P, Alexandre L, Giuliano F (2008) Ejaculation elicited by microstimulation of lumbar spinothalamic neurons. *Eur Urol* 54:449-456.
15. Brindley GS, Sauerwein D, Hendry WF (1989) Hypogastric plexus stimulators for obtaining semen from paraplegic men. *Br J Urol* 64: 72-77.

16. Canseco-Alba A, Rodríguez-Manzo G (2013) Anandamide transforms non-copulating rats into sexually active males. *J Sex Med* 10: 686-693.
17. Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW (1995) Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: A PHAL study in the rat. *J Comp Neurol* 360: 213-245.
18. Carro-Juárez M, Rodríguez-Manzo G (2005) Evidence for the presence and functioning of the spinal generator for ejaculation in the neonatal male rat. *Int J Imp Res* 17: 270-276.
19. Chasin CJ (2011) Theoretical issues in the study of asexuality. *Arch Sex Behav* 40: 713-723.
20. Clark MM, Galef BG Jr (2000) Why some male Mongolian gerbils may help at the nest: Testosterone, asexuality and alloparenting. *Anim Behav* 59: 801-806.
21. Cooke MB, Breedlove SM, Jordan CL (2003) Both estrogen receptors contribute to testosterone-induced changes in the morphology of the medial amygdala and sexual arousal in male rats. *Horm Behav* 43: 336-346.
22. Coolen LM, Allard J, Truitt W, McKenna KE (2004) Central regulation of ejaculation. *Physiol Behav* 83: 203-215.
23. Coolen LM, Peters HJ, Veening JG (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: 421-435.
24. Coolen LM, Veening JG, Wells AB, Shipley MT (2003) Afferent connections of the parvocellular subparafascicular thalamic nucleus in the rat: Evidence for functional subdivisions. *J Comp Neurol* 163: 132-156.

25. Coopersmith C, Erskine MS (1994) Influence of paced mating and number of intromissions on fertility in the laboratory rat. *J Reprod Fertil* 102: 451-458.
26. Dail WG, Evan AP, Eason HR (1975) The major pelvic ganglion in the pelvic plexus of the male rat. *Cell Tissue Res* 159: 49-62.
27. Dail WG, Trujillo D, de La Rosa D, Walton G (1989) Autonomic innervation of reproductive organs: Analysis of the neurons whose axons project in the main penile nerve in the pelvic plexus of the rat. *Anat Rec* 224:94-101.
28. del Barco-Trillo J, Ferkin MH (2004) Male mammals respond to a risk of sperm competition conveyed by odours of conspecific males. *Nature* 431: 446-449.
29. de Groat WC, Steers WD (1988) Neural control of urinary bladder and sexual organs: Experimental studies in animals. In: *Autonomic Failure: A Textbook of Clinical Disorders of the Autonomous Nervous System* (R Bannister, Ed.) Oxford University Press, Oxford. pp 196-222.
30. Dewsbury DA (1972) Patterns of copulatory behavior in male mammals. *Q Rev Biol* 47: 1-33.
31. Dewsbury DA, Hartung TG (1980) Copulatory behaviour and differential reproduction of laboratory rats in a two-male, one-female competitive situation. *Anim Behav* 28: 95-102.
32. Erskine MS (1989) Solicitation behavior in the estrous female rat: A review. *Horm Behav* 23: 473-502.
33. Erskine MS, MacLusky NJ, Baum MJ (1985) Effect of 5 α -dihydrotestosterone on sexual receptivity and neural progesterin receptors in ovariectomized rats given pulsed estradiol. *Biol Reprod* 33: 551-559.

34. Estep DQ (1988) Copulations by other males shorten the post-ejaculatory intervals of pairs of roof rats, *Rattus rattus*. *Anim Behav* 36: 299-300.
35. Ferri R, Todon E Silva AF, Cabral D, Moreira N, Spinosa HS, Bernardi MM (2013) Doramectin reduces sexual behavior and penile erection in male rats. *Neurotoxicol Teratol* 39: 63-68.
36. Fuentes-Morales MR, Gutiérrez-Ospina G, Fernández-Guasti A, Cruz Y, Lucio RA (2020) Rats ejaculate prematurely and increase sperm output during competitive mating. *Ethol Ecol Evol* 32: 351-360.
37. Gerstenberg TC, Levin RJ, Wagner G (1990) Erection and ejaculation in man- assessment of the electromyographic activity of the bulbocavernosus and ischiocavernosus muscles. *Br J Urol* 65: 395-402.
38. Gilman DP, Mercer LF, Hitt JC (1979) Influence of female copulatory behavior on the induction of pseudopregnancy in the female rat. *Physiol Behav* 22: 675-678.
39. Giuliano F, Clement P (2005) Physiology of ejaculation: Emphasis on serotonergic control. *Eur Urol* 48: 408-417.
40. Gomendio M, Harcourt AH, Roldán ERS (1998) Sperm competition in mammals. In: *Sperm Competition and Sexual Selection*. (TR Birkhead, AP Moller, Eds.) Academic Press, San Diego, CA. pp 667-751.
41. Greene EC (1959) *Anatomy of the Rat*. Hafner Publishing. New York.
42. Harding CF, Feder HH (1976) Relation between individual differences in sexual behavior and plasma testosterone levels in the guinea pig. *Endocrinology* 98: 1198-1205.
43. Heeb MM, Yahr P (2001) Anatomical and functional connections among cell groups in the gerbil brain that are activated with ejaculation. *J Comp Neurol* 439: 248-258.

44. Hogg JT (1988) Copulatory tactics in relation to sperm competition in Rocky Mountain bighorn sheep. *Behav Ecol Sociobiol* 22: 49-59.
45. Holmes GM, Chapple WD, Leipheimer RE, Sachs BD (1991) Electromyographic analysis of male rat perineal muscles during copulation and reflexive erections. *Physiol Behav* 49: 1235-1246.
46. Holmes GM, Sachs BD (1991) The ejaculatory reflex in copulating rats: Normal bulbospongiosus activity without apparent urethral stimulation. *Neurosci Lett* 125: 195-197.
47. Hulsebosch CE, Coggeshall RE (1982) An analysis of the axon populations in the nerves to the pelvic viscera in the rat. *J Comp Neurol* 211: 1-10.
48. Hull EM, Wood RI, McKenna KE (2006) Neurobiology of male sexual behavior. In: Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*. (JD Neill, Ed.) Elsevier, St. Louis MO, pp1730-1824.
49. Ju G, Melander T, Ceccatelli S, Hokfelt T, Frey P (1987) Immunohistochemical evidence for a spinothalamic pathway containing cholecystokinin- and galanin-like immunoreactivities in the rat. *Neuroscience* 20: 439-456.
50. Kaleczyc J, Scheuermann DW, Pidsudko Z, Majewski M, Lakomy M, Timmermans JP (2002) Distribution, immunohistochemical characteristics and nerve pathways of primary sensory neurons supplying the porcine vas deferens. *Cell Tissue Res* 310: 9-17.
51. Keast JR (1995) Pelvic ganglia. In: *Autonomic Ganglia*. (EM McLahlan, Ed.) Harwood Academic, Luxemburg. pp 445-479.

52. Keast JR, Booth AM, de Groat WC (1989) Distribution of neurons in the major pelvic ganglia of the rat which supply the bladder, colon or penis. *Cell Tissue Res* 256: 105-112.
53. Larsson K (1956) *Conditioning and Sexual Behavior in the Male Albino Rat*. Stockholm: Almqvist and Wiksells Stockholm. pp 101-113.
54. Larsson K (1959) The effect of restraint upon copulatory behavior in the rat. *Anim Behav* 7: 23-25
55. Larsson K (1961) The importance of time for the intromission frequency in the male rat matingbehavior. *Scand J Phychol* 2: 149-152.
56. Lauman EO, Nicolosi A, Glasser DB, Paik A, Gingell C, Moreira E, Wang T (2005) Sexual problems among women and men aged 40-80 y: Prevalence and correlates identified in the global study of sexual attitudes and behaviors. *Int J Imp Res* 17: 39-57.
57. Lemaitre JF, Ramm SA, Hurst JL, Stockley P (2011) Social cues of sperm competition influence accessory reproductive gland size in a promiscuous mammal. *Proc R Soc B* 278: 1171-1176.
58. Le Moëne O, Agmo A (2019) Modeling human sexual motivation in rodents: Some caveats. *Front Behav Neurosci* 13: 187.
59. Lisk RD (1969) Reproductive potential of the male rat: Enhancement of copulatory levels following lesions of the mammillary body in sexually non-active and active animals. *J Reprod Fertil* 19: 353-356.
60. Loranca-Cortez MA (1993) Participación del nervio hipogástrico en la conducta copulatoria de la rata macho (*Rattus norvegicus*). Tesis de Licenciatura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

61. Lucio RA, Fernández-Guasti A, Larsson K (2017) Male sexual satiety and the Coolidge effect in rats: Relation between behavioral and seminal parameters. In: Behavioral Neuroendocrinology. (BR Komisaruk, G González-Mariscal, Eds.) CRC Press, Boca Raton, FL. pp 83-101.
62. Lucio RA, Rodríguez-Piedracruz V, Tlachi-López JL, García-Lorezana M, Fernández-Guasti A (2014) Copulation without seminal expulsion: The consequence of sexual satiation and the Coolidge effect. *Andrology* 2: 450-457.
63. Lucio RA, Tlachi-López JL (2008) Análisis de la Cópula y el Eyaculado de la Rata Albina (*Rattus norvegicus*). Manual de Laboratorio. México. ISBN 978-968-865-152-0. pp 1-48.
64. Luiten PG, Horst GJ, Karst H, Steffens AB (1985) The course of paraventricular hypothalamic efferents to autonomic structures in medulla and spinal cord. *Brain Res* 329: 374-378.
65. Manzo J, Lucio RA, Martínez-Gómez, M, Komisaruk BR, Pacheco P (1989) Relationships of the pelvic nerve branches with copulatory performance. *Soc Neurosci Abstr* 15, 115.
66. Marson L (2004) Lesions of the periaqueductal gray block the medial preoptic area-induced activation of the urethro-genital reflex in male rats. *Neurosci Lett* 367: 278-282.
67. Marson L, McKenna KE (1990) A role for 5-hydroxytryptamine in descending inhibition of spinal sexual reflexes. *Exp Brain Res* 88: 313-320.
68. McClintock MK, Adler NT (1978) The role of the female during copulation in the wild and domestic Norway rat (*Rattus norvegicus*). *Behaviour* 67: 67-96.

69. McClintock MK, Anisko JJ, Adler NT (1982) Group mating among Norway rats II. The social dynamics of copulation: Competition, cooperation, and mate choice. *Anim Behav* 30: 410-425.
70. McKenna KE, Chung SK, McVary KT (1991) A model for the study of sexual function in anesthetized male and female rats. *Am J Physiol* 261: R1276-R1285.
71. McKenna KE, Nadelhaft I (1986) The organization of the pudendal nerve in the male and female rat. *J Comp Neurol* 248: 532-549.
72. Meisel RL, Sachs BD (1994) The physiology of male sexual behavior. In: *Physiology of Reproduction* (E Knobil, JD Neill, Eds.) Raven Press, New York. pp 3-106.
73. Mitsuya H, Asai J, Suyama, K, Ushida T, Hosoe K (1976) Application of X-ray cinematography in urology: I. Mechanism of ejaculation. *J Urol* 83: 86-92.
74. Moralí G, Hernández G, Beyer C (1986) Restoration of copulatory pelvic thrusting pattern in castrated male rats by the intracerebral implantation of androgen. *Physiol Behav* 36: 495-499.
75. Murphy AZ, Rizvi TA, Ennis M, Shipley MT (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: 1103-1116.
76. Nadelhaft I, Booth AM (1984) The location and morphology of preganglionic neurons and the distribution of visceral afferents from the rat pelvic nerve: a horseradish peroxidase study. *J Comp Neurol* 226: 238-245.
77. Nadelhaft I, McKenna KE (1987) Sexual dimorphism in sympathetic preganglionic neurons of the rat hypogastric nerve. *J Comp Neurol* 256: 308-315.

78. Newman H, Reiss H, Northrup JD (1982) Physical basis of emission, ejaculation, and orgasm in the male. *Urology* 19: 341-350.
79. Nuñez R, Gross GH, Sachs BD (1986) Origin and central projections of rat dorsal penile nerve: Possible direct projections to autonomic and somatic neurones by primary afferents of nonmuscle origin. *J Comp Neurol* 247: 417-429.
80. Olivier B, Chan JS, Pattij T, de Jong TR, Oosting RS, Veening JG, Waldinger MD (2006) Psychopharmacology of male rat sexual behavior: Modeling human sexual dysfunctions? *Int J Imp Res* 18: Suppl S14-S23.
81. Orbach J (1961) Spontaneous ejaculation in the rat. *Science* 134: 1072-1073.
82. Orbach J, Miller, Billimoria A, Solhkhah N (1967) Spontaneous seminal ejaculation and genital grooming in male rats. *Brain Res* 5: 520-523.
83. Pacheco P, Camacho MA, García LI, Hernández ME, Carrillo P, Manzo J (1997) Electrophysiological evidence for the nomenclature of the pudendal nerve and sacral plexus in the male rat. *Brain Res* 763: 202-208.
84. Paredes RG, Vazquez B (1999) What do female rats like about sex? Paced mating. *Behav Brain Res* 195: 117-127.
85. Parker GA (1970) Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biol. Rev* 45: 525-567.
86. Parker GA (1998) Sperm competition and the evolution of ejaculates: Towards a theory base. In: *Sperm Competition and Sexual Selection*. (TR Birkhead, AP Moller, Eds.) Academic Press, London. pp 3-54.
87. Pascual JI, Insausti R, Gonzalo LM (1992) Pudendal nerve topography in the rat spinal cord projections studied with the axonal tracer wheat germ agglutinin conjugated-horseradish peroxidase. *J Urol* 147: 718-722.

88. Pattij T, de Jong TR, Uitterdijk A, Waldinger MD, Veening JG, Cools AR, van der Graaf PH, Olivier B (2005) Individual differences in male rat ejaculatory behaviour: Searching for models to study ejaculation disorders. *Eur J Neurosci* 22:724-734.
89. Pennefather JN, Lau WA, Mitchelson F, Ventura S (2000) The autonomic and sensory innervation of the smooth muscle of the prostate gland: A review of pharmacological and histological studies. *J Auton Pharmacol* 20: 193-206.
90. Poani A (2006) Complexity of seminal fluid: A review. *Behav Ecol Sociobiol* 60: 289-310.
91. Portillo W, Antonio-Cabrera E, Camacho FJ, Díaz NF, Paredes RG (2013) Behavioral characterization of non-copulating male mice. *Horm Behav* 64: 70-80.
92. Portillo W, Camacho F, Eguibar JR, Paredes RG (2010) Behavioral characterization of non-copulating male rats with high spontaneous yawning frequency rate. *Behav Brain Res* 214: 225-230.
93. Portillo W, Castillo CG, Retana-Marquez S, Roselli CE, Paredes RG (2006a) Neuronal activity of aromatase enzyme in non-copulating male rats. *J Neuroendocrinol* 19: 139-141.
94. Portillo W, Diaz NF, Cabrera EA, Fernandez-Guasti A, Paredes RG (2006b) Comparative analysis of immunoreactive cells for androgen receptors and oestrogen receptor alpha in copulating and non-copulating male rats. *J Neuroendocrinol* 18: 168-176.
95. Portillo W, Paredes RG (2004) Sexual incentive motivation, olfactory preference, and activation of the vomeronasal projection pathway by sexually relevant cues in non-copulating and naïve male rats. *Horm Behav* 46: 330-430.

96. Pottier JJ, Baran D (1973) A general behavioral syndrome associated with persistent failure to mate in the male laboratory rat. *J Comp Physiol Psychol* 83: 499-509.
97. Pound N, Gage MJG (2004) Prudent sperm allocation in Norway rats, *Rattus norvegicus*: A mammalian model of adaptive ejaculate adjustment. *Anim Behav* 68: 819-823.
98. Purinton PT, Fletcher TF, Bradley WE (1973) Gross and light microscopic features of the pelvic plexus in the rat. *Anat Rec* 175: 697-705.
99. Rizvi TA, Ennis M, Shipley MT (1992) Reciprocal connections between the medial preoptic area and the midbrain periaqueductal gray in rat: A WGA-HRP and PHA-L study. *J Comp Neurol* 315: 1-15.
100. Rodríguez-Manzo G, Canseco-Alba A (2015) Anandamide reduced the ejaculatory threshold of sexually sluggish male rats: Possible relevance for human lifelong delayed ejaculation disorder. *J Sex Med* 12: 1128-1135.
101. Roselli CE, Horton LE, Resko JA (1985) Distribution and regulation of aromatase activity in the rat hypothalamus and limbic system. *Endocrinology* 117: 2471-2477.
102. Schlegel PN, Walsh PC (1987) Neuroanatomical approach to radical cystoprostatectomy with preservation of sexual function. *J Urol* 16: 46-60.
103. Schroder HD (1980) Organization of motoneurons innervating the pelvic muscles of the male rat. *J Comp Neurol* 192: 567-587.
104. Schroder HD (1985) Anatomical and pathoanatomical studies on the spinal efferent systems innervating pelvic structures. 1. Organization of spinal nuclei in animals. 2. The nucleus X-pelvic motor system in man. *J Auton Nerv Syst* 14: 23-48.

105. Setchell BP, Maddocks S, Brooks DE (1994) Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract. In: *The Physiology of Reproduction*. (E Knobil, JD Neill, Eds.) Raven Press, New York. pp 1063-1177.
106. Simerly RB, Swanson LW (1988) Projections of the medial preoptic nucleus: A Phaseolus vulgaris leucoagglutinin anterograde tract-tracing study in the rat. *J Comp Neurol* 270: 209-242.
107. Stefanick ML, Davidson JM (1987) Genital responses in noncopulators and rats with lesions in the medial preoptic area or midthoracic spinal cord. *Physiol Behav* 41: 439-444.
108. Taylor DCM, Korf HW, Pierau FK (1982) Distribution of sensory neurones of the pudendal nerve in the dorsal root ganglia and their projection to the spinal cord. *Cell Tissue Res* 226: 555-564.
109. Tlachi-López JL, Eguibar JR, Fernández-Guasti A, Lucio RA (2012) Copulation and ejaculation in male rats under sexual satiety and the Coolidge effect. *Physiol Behav* 106: 626-630.
110. Truitt WA, Coolen LM (2002) Identification of a potential ejaculation generator in the spinal cord. *Science* 297: 1566-1569.
111. van Houdenhove E, Gijs L, T'Sjoen G, Enzlin P (2014) Asexuality: Few facts, many questions. *J Sex Marital Ther* 40: 175-192.
112. Waldinger MD (2005) Lifelong premature ejaculation: Definition, serotonergic neurotransmission and drug treatment. *World J Urol* 23: 102-108.
113. Waldinger MD, Hengeveld MW, Zwinderman AH (1994) Paroxetine treatment of premature ejaculation: A double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Am J Psychiatry* 151: 1377-1379.

114. Waldinger MD, McIntosh J, Schweitzer DH (2009) A five-nation survey to assess the distribution of the intravaginal ejaculatory latency time among the general male population. *J Sex Med* 6: 2888-2895.
115. Waldinger MD, Quinn P, Dilleen M, Mundayat R, Schweitzer DH, Boolell M (2005) A multinational population survey of intravaginal ejaculation latency time. *J Sex Med* 22: 492-497.
116. Whalen RE, Beach FA, Kuehn RE (1961) Effects of exogenous androgen on sexually responsive and unresponsive male rats. *Endocrinology* 69: 373-380.
117. Whipple B, Myers BR, Komisaruk BR (1998) Male multiple ejaculatory orgasms: A case study. *J Sex Educ Ther* 23: 157-162.
118. Xu C, Giuliano F, Yaici ED, Conrath M, Trassard O, Benoit G, Verge D (2006) Identification of lumbar spinal neurons controlling simultaneously the prostate and the bulbospongiosus muscles in the rat. *Neuroscience* 138: 561-573.
119. Zempoalteca R, Martínez-Gómez M, Hudson R, Cruz Y, Lucio RA (2002) An anatomical and electrophysiological study of the genitofemoral nerve and some of its targets in the male rat. *J Anat* 201: 493-505.
120. Zhang GX, Yu LPZ, Bai WJ, Wang XF (2012) Selective resection of dorsal nerves of penis for premature ejaculation. *Int J Androl* 35: 873-879.